

Synthese und Eigenschaften neuer peptidischer Phosphatase-Inhibitoren auf Phosphonat-Basis

Von der
Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Arndt Christian Wiemann
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland

2. Referentin: Prof. Dr. Sabine Laschat

eingereicht am 10.05.1999

mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.09.1999

Synthese und Eigenschaften neuer peptidischer Phosphatase-Inhibitoren auf Phosphonat-Basis

Von der
Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Arndt Christian Wiemann
aus Braunschweig

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1995 bis März 1999 in der Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung (Dr. Ronald Frank) in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig unter der Leitung von Dr. Werner Tegge durchgeführt.

Ich möchte mich bei Werner Tegge für die Überlassung des Themas bedanken, für die vielen Hilfen und Unterstützungen sowie für das Interesse an der Arbeit.

Des weiteren danke ich Dr. Ronald Frank für die Unterstützung im Rahmen der Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit der Teilnahme an dem 25. Europäischen Peptidsymposium. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung danke ich für die fachlichen und sonstigen Hilfen, Gespräche und Tips sowie für das angenehme Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt Brigitte Kornak für die Peptidsynthesen.

Bei den Mitarbeitern der zentralen Einrichtungen der GBF bedanke ich mich für die Anfertigung diverser Analysen: vor allem bei Christel Kakoschke und Beate Jaschok-Kentner für die Messungen von knapp 1000 NMR-Proben, und bei Dr. Michael Kies sowie Rita Getzlaff für die Aminosäureanalysen und Sequenzierungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung für immerhin 2 Jahre (Te 136/4-1) sowie der GBF für die anschließende Finanzierung.

Ferner möchte ich allen danken, die mir die Zeit so angenehm gemacht haben, insbesondere bei meinen Eltern und vor allem bei Corinna für ihr Verständnis und ihre Hilfe.

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor/die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

Tagungsbeitrag

Wiemann, A. & Tegge, W.: „Peptides Containing New Phosphatase resistant Derivatives of Phosphoserine and their Properties as Phosphatase Inhibitors.“, (Poster), 25. Europäisches Peptid-Symposium, Budapest, **1998**.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit	2
2	Theoretischer Teil	3
2.1	Proteine, Peptide und Aminosäuren	3
2.2	Die chemische Peptidsynthese	5
2.2.1	Historische Entwicklung	5
2.2.2	Festphasen-Peptidsynthese	6
2.2.3	Schutzgruppen in der Peptidsynthese	8
2.2.3.1	Temporäre Schutzgruppen	10
2.2.3.2	Permanente Schutzgruppen	11
2.2.4	Kopplung der Aminosäure	13
2.2.5	Synthesestrategien und Grenzen der Verfahren	16
2.3	Phosphorylierte Peptide und Phosphatasen	17
2.4	Enzymkinetik	24
2.4.1	Theorie der Enzymkinetik nach Michaelis-Menten	24
2.4.2	Auswertung der Daten	27
2.4.2.1	Direkte Auftragung	27
2.4.2.2	Lineweaver-Burk-Diagramm	28
2.4.2.3	Hanes-Diagramm	29
2.4.2.4	Eadie-Hofstee-Diagramm	29
2.4.3	Kompetitive Inhibition von Enzymen	30
2.4.3.1	Lineweaver-Burk-Diagramm	31
2.4.3.2	Hanes-Diagramm	32
2.4.3.3	Eadie-Hofstee-Diagramm	32
2.4.3.4	Dixon-Diagramm	33
3	Synthese der Aminosäure-Derivate	34
3.1	Phosphat-Phosphonat-Derivate	35
3.1.1	Syntheseplanung	35

3.1.2	Darstellung von N-(Benzyloxycarbonyl)-L-asparaginsäure-4-chlorid-1-benzylester (Z-Asp(Cl)-OBzl, 1)	36
3.1.3	Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphato-4-dialkylphosphono-buttersäure-benzylester (Z-Appb(R ₄)-OBzl, 2a und 2b)	37
3.1.4	Darstellung von (2L)-2-Amino-4-dialkylphosphato-4-dialkylphosphono-buttersäure (Appb(R ₄), 3a und 3b)	38
3.1.5	Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphato-4-dialkylphosphono-buttersäure (Fmoc-Appb(R ₄)-OH, 4a und 4b)	38
3.2	Hydroxyphosphonat-Derivate	41
3.2.1	Synthesepanung	41
3.2.2	Darstellung des N-(Benzyloxycarbonyl)-L-homoserin-1-benzylesters (Z-Hse-OBzl, 5)	43
3.2.3	Darstellung von N-(Benzyloxycarbonyl)-L-asparaginaldehyd-1-benzylester (Z-Asa-OBzl, 6)	44
3.2.4	Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphono-4-hydroxy-buttersäure-benzylester (Z-Ahpb(R ₂)-OBzl, 7a und 7b)	45
3.2.5	Darstellung von (2L)-2-Amino-4-dialkylphosphono-4-hydroxy-buttersäure (Ahpb(R ₂), 8a und 8b)	46
3.2.6	Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphono-4-hydroxy-buttersäure (Fmoc-Ahpb(R ₂)-OH, 9a und 9b)	46
3.2.7	Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure-benzylester (Z-Ahpb(THP, R ₂)-OBzl, 10a und 10b)	48
3.2.8	Darstellung von (2L)-2-Amino-4-dialkylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure (Ahpb(THP, R ₂), 11a und 11b)	49
3.2.9	Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure (Fmoc-Ahpb(THP, R ₂)-OH, 12a und 12b)	49
3.2.10	Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-di- <i>tert</i> -butylphosphono-4-(methoxyethoxymethoxy)-buttersäure-benzylester (Z-Ahpb(MEM, R ₂)-OBzl, 10c)	50
3.2.11	Darstellung der (2L)-2-Amino-4-di- <i>tert</i> butylphosphono-4-(methoxyethoxymethoxy)-buttersäure (Ahpb(MEM, <i>t</i> Bu ₂), 11c)	50

3.2.12	Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-di- <i>tert</i> -butylphosphono-4-methoxyethoxymethoxy-buttersäure (Fmoc-Ahpb(MEM, <i>t</i> Bu ₂)-OH, 12c)	51
4	Synthese der Peptide	52
4.1	Synthese der Sequenz 1 (Ac-A-A-E-G-G-S-X-N-V-F-S-K-NH ₂)	53
4.1.1	Synthese der unphosphorylierten Sequenz 1.0	54
4.1.2	Synthese der phosphorylierten Sequenz 1.1	54
4.1.2.1	Synthese mit globaler Phosphorylierung	54
4.1.2.2	Synthese mit einem vorphosphorylierten Aminosäurebaustein	56
4.1.3	Versuche zur Synthese der thiophosphorylierten Sequenz 1.2	56
4.1.4	Synthese der Phosphat-Phosphonat-Peptide 1.3a und 1.3b	57
4.1.5	Synthese der Hydroxyphosphonat-Peptide 1.4a und 1.4	60
4.2	Synthese der Sequenz 2 (R-R-R-R-A-A-X-V-A-NH ₂)	62
4.2.1	Synthese der phosphorylierten Sequenz 2.1	63
4.2.1.1	Synthese mit globaler Phosphorylierung	63
4.2.1.2	Synthese mit vorphosphoryliertem Baustein	64
4.2.1.3	Enzymatische Phosphorylierung	64
4.2.2	Versuch zur Synthese der thiophosphorylierten Sequenz 2.2	65
4.2.3	Synthese des Hydroxyphosphonat-Peptids 2.3	65
4.3	Entschützung der Peptide	66
4.3.1	Zusammenfassung der bereits publizierten Methoden	66
4.3.2	Entschützung des Phosphat-Phosphonat-Peptids 1.3a bzw. 1.3b	69
4.3.3	Versuche zur Entschützung des Hydroxyphosphonat-Peptids 1.4a	74
5	Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften der Peptide	76
5.1	Phosphat-Phosphonat-Peptide	77
5.2	Hydroxyphosphonat-Peptid	84
6	Zusammenfassung und Ausblick	90
6.1	Zusammenfassung	90
6.2	Ausblick	92
7	Experimenteller Teil	93
7.1	Allgemeine Angaben	93
7.2	Darstellung der Phosphat-Phosphonat-Derivate	98
7.3	Darstellung der Hydroxyphosphonat-Derivate	104

7.4	Synthese der Peptidsequenz 1	116
7.5	Synthese der Peptidsequenz 2	127
7.6	Kinetische Untersuchungen	130
	Literaturverzeichnis	134
	Abkürzungsverzeichnis und Hinweise zur Nomenklatur	I
	Anhang 1: proteinogene Aminosäuren	IV
	Anhang 2: NMR-Numerierung der Substanzen	VI

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen und Peptiden sind Modifikationen mit großer Bedeutung in der Zellbiologie und Biochemie; viele zelluläre Mechanismen werden dadurch beeinflusst. In der Signaltransduktion ist die Phosphorylierung ein wichtiger Schritt bei der Weiterleitung eines chemischen Signals, z. B. der Bindung eines Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor. Die Regulation von Enzymen erfolgt oft ebenfalls durch diese Modifikationen: Die Phosphorylierung kann durch Aktivierung des Enzyms zu einer Reaktionskaskade führen [Krebs und Fischer, 1993]. Auf diese Weise werden auch die Zellteilung sowie die Zelldifferentiation beeinflusst.

Die Enzyme, die an der Phosphorylierung und Dephosphorylierung beteiligt sind, werden als Proteinkinasen bzw. Proteinphosphatasen bezeichnet. Die Kinasen übertragen mit hoher Spezifität den γ -Phosphatrest von ATP (seltener von GTP) hauptsächlich auf die Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin unter Bildung der Phosphorsäuremonoester. Die dazu antagonistischen, relativ unspezifischen Phosphatasen spalten den Ester unter Bildung von anorganischem Phosphat. Wegen der großen Bedeutung, die diese Enzyme besitzen, besteht für sie ein hoher Bedarf an Substraten und Inhibitoren. Unter den Inhibitoren, die sich von dem regulären Phosphopeptid ableiten, weisen die Phosphonat-Derivate die vielversprechendsten Eigenschaften auf. Die wichtigste ist die völlige Hydrolysestabilität gegenüber Phosphatasen. Der Nachteil liegt darin, daß diese Gruppen nicht nachträglich in Peptide oder Proteine eingeführt werden können, sowie in der bei einigen Derivaten deutlich schlechteren Affinität zu den Enzymen. Im folgenden sind zwei Phosphonat-Strukturen dargestellt, die die gute Eignung als Inhibitoren verdeutlichen:

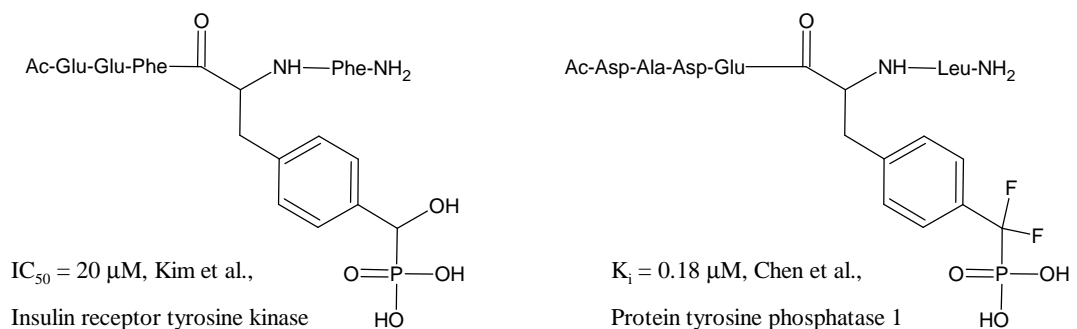


Abb. 1.1: Phosphonat-Derivate als Inhibitoren für Kinasen und Phosphatasen

Die Phosphonate müssen zunächst in die entsprechenden Aminosäuren eingeführt werden, damit diese dann mit der chemischen Peptidsynthese in Peptide inkorporiert werden können.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von dem beschriebenen Synthesekonzept einer Aminosäure mit einer Phosphat-Phosphonat-Struktur (Abb. 1.2; [Wiemann, 1995]) sollte diese mittels Festphasen-Peptidsynthese in Peptide eingebaut und auf ihre Verwendung als

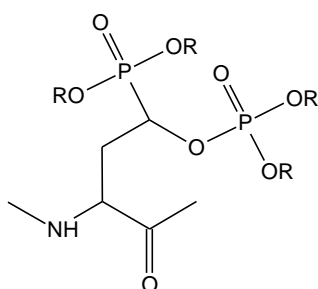


Abb. 1.2: Phosphat-Phosphonat-Struktur

Phosphatase-Inhibitor getestet werden. Dazu waren zunächst verschiedene Schutzgruppen für die Phosphor- und Phosphonsäuregruppen zu evaluieren. Der nächste Schritt bestand in der Optimierung der Inkorporation der Aminosäure in eine Teilsequenz des Proteins Myosin Light Chain (MLC) sowie in der anschließenden Ent-

schützung des Peptids. Die inhibitorische Wirkung dieses Derivates gegenüber der alkalischen Phosphatase sollte getestet werden. Es war zu erwarten, daß das Phosphat-Phosphonat zunächst zum Hydroxyphosphonat umgesetzt wird (Abb. 1.3), welches dann die Phosphatase inhibieren sollte.

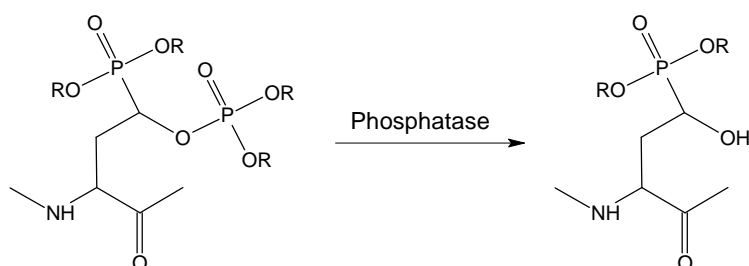


Abb. 1.2: Dephosphorylierung der Phosphat-Phosphonat-Struktur

Als Alternative sollte die Hydroxyphosphonat-Struktur direkt in einen Aminosäurebaustein eingeführt werden, um diesen in analoger Weise in zwei Peptide einzubauen. Eines der Peptide leitete sich ebenfalls von dem Protein MLC ab, das andere war ein Derivat eines Substrats der Proteinphosphatase 2A. Auch bei dem Hydroxyphosphonat galt es, die Schutzgruppenwahl sowie die Peptidsynthese zu optimieren und die Eignung als Inhibitoren der jeweiligen Phosphatase zu testen.

2 Theoretischer Teil

2.1 Proteine, Peptide und Aminosäuren

Die Klasse der Proteine nimmt unter den biologischen Polymeren neben den Nukleinsäuren und Polysacchariden eine herausragende Stellung ein. Diese außerordentliche Wichtigkeit verdanken die Proteine der vielseitigen Verwendung im Organismus. So bilden sie nicht nur in Form von Kollagen oder als Muskelbestandteil einen Großteil der physischen Struktur des Körpers höherer Tiere aus, sondern dienen auch als Antigen oder Botenstoff als Informationsträger. Die größte Vielfalt weisen die Proteine als Vermittler nahezu aller im Körper ablaufenden verschiedenartigsten Reaktionen auf. Proteine mit letzterer Funktion werden als Enzyme bezeichnet: Sie besitzen die gleiche Wirkungsweise wie ein klassischer Katalysator. Ihre Vielseitigkeit kommt in dem von Berzelius für diese Makromoleküle eingeführten Begriff Protein (griech. *protos* „das Erste“, „das Wichtigste“) zum Ausdruck. Als Proteine werden die unverzweigten Polymere mit Molekülmassen von ca. 10 000 Dalton aufwärts bezeichnet. Liegt deren Masse darunter, so werden diese Oligomere als Peptide bezeichnet, wobei die Grenze von 100 „Monomeren“ willkürlich gesetzt und nicht durch biochemische Eigenschaften bestimmt ist. Die Tatsache, daß sowohl Proteine als auch Peptide prinzipiell die gleichen Funktionen ausüben können, verdeutlicht dies. So sind etliche Enzyme bekannt, die aufgrund der Größe als Peptide zu klassifizieren sind. Den Namen Peptide verdanken sie dem Umstand, daß sie aus Proteinen durch Verdau (griech. *peptos*) erhalten werden können.

In den Monomeren der Peptide und Proteine, den Aminosäuren, befinden sich die namensgebenden Carboxyl- und Aminogruppen an demselben C-Atom, daher werden sie als α -Aminosäuren bezeichnet. Zusätzlich besitzt das α -C-Atom neben einem Proton eine weitere Gruppe, die *Seitenkette*. Aus den vier verschiedenen Resten folgt, daß das α -C-Atom und damit die Aminosäure chiral ist. Einzige Ausnahme ist das achirale Glycin, dessen Seitenkette ebenfalls ein Proton ist. Nach dem Nomenklatorsystem von Cahn, Ingold und Prelog gehören die *proteinogenen* („natürlichen“) Aminosäuren (s. Anhang 1) zur *S*-Reihe, sie werden aber aus historischen Gründen mit *L*- bezeichnet. Die Aminosäuren sind durch eine *Peptidbindung* genannte Amidbindung miteinander verknüpft, formal betrachtet sind Proteine und Peptide demnach Polyamide. Der beobachtete Bindungsgrad der Peptidbindung liegt dabei zwischen einer Einzel- und einer Doppelbindung. Die dadurch resultierende eingeschränkte Drehbarkeit um diese Bindung hat eine erhöhte Festigkeit der räumlichen Struktur zur Folge. Die Reihe der

Peptidbindungen wird als Hauptkette oder *backbone* bezeichnet. Wird eine Peptidsequenz in abgekürzter Form geschrieben (Drei- oder Einbuchstaben-Code), so steht die N-terminale Aminosäure laut Konvention links, die C-terminale Aminosäure rechts.

Die Struktur von Proteinen läßt sich in Unterklassen einteilen. Die *Primärstruktur* ist die Sequenz, die reine Abfolge der Aminosäuren in der Kette. Die *Sekundärstruktur* ergibt sich aus den Wechselwirkungen zwischen den Haupt- und Seitenketten, hauptsächlich ionischer und hydrophober Natur sowie den Wasserstoffbrückenbindungen. Sie alle führen zu einer bestimmten Nahordnung im Raum. Wichtigste Elemente sind Schrauben (α -*Helices*), Faltblätter (β -*sheets*) und Kehren (*turns*). Diese Strukturelemente wiederum nehmen im Raum ebenfalls eine bestimmte Anordnung an, die als *Tertiärstruktur* bezeichnet wird und die die äußere Form eines Proteins darstellt. Liegt ein Proteinkomplex aus mehreren Untereinheiten vor, so gibt die *Quartärstruktur* deren räumliche Anordnung an.

Die Biosynthese von Proteinen erfolgt durch ein komplexes System von Vorgängen, die von Enzymen gesteuert werden. Die Grundzüge der Vorgänge in mehrzelligen Organismen (Eukarionten) werden im folgenden kurz erläutert. Das zentrale Dogma der Molekularbiologie sagt aus, daß die Sequenz aller Proteine eines Organismus in seinem Genom, seiner Erbinformation, festgelegt ist. Das Genom enthält einzelne Gene, Abschnitte aus Desoxyribonukleinsäure-(DNA-)ketten. Diese Ketten liegen als doppelter Strang vor und bestehen aus einem alternierenden Phosphat-Zucker-Rückgrat, dessen Zuckerbestandteil, die Desoxyribose, eine von vier stickstoffhaltigen heterocyclischen Basen trägt. Dabei ist jeder Base eines Stranges aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen immer eine bestimmte Base auf dem anderen Strang gegenüber positioniert. Bei dieser zuerst von Watson und Crick postulierten *Basenpaarung* trifft es auf Adenin und Thymin bzw. auf Guanin und Cytosin zu. In der *Transkription* eines Proteins wird der Doppelstrang zunächst getrennt. Von einem Strang synthetisiert ein Enzymkomplex unter Einfluß der Basenpaarung einen dazu komplementären Strang aus Ribonukleinsäuren (RNA) quasi als Negativ. Diese sogenannte *messenger-RNA* wird nach einem Modifikationsprozeß, *spleißen* genannt, in der *Translation* als Vorlage für das Protein benutzt. Jeweils drei aufeinander-folgende Basen des Strangs bilden ein *Codon*, das einer bestimmten Aminosäure im Protein entspricht. An dieses Codon lagert sich von den Ribosomen unterstützt eine *transfer-RNA* (tRNA) an, die das Anticodon und die entsprechende Aminosäure trägt. Anschließend wird diese Aminosäure mit dem N-Terminus an ein bereits vorhandenes Proteinstück gekoppelt. Die Biosynthese verläuft also vom N-Terminus zum C-Terminus (N-nach-C-Richtung) und

ist aufgrund der beteiligten stereospezifischen Enzyme racemisierungsfrei. Nach Abschluß der Synthese werden die Proteine in ihre endgültige räumliche Struktur (*Konformation*) gefaltet und oft zusätzlich modifiziert. Zu diesen *translationalen Modifikationen* zählen die Abspaltung von Signalpeptiden, die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen, die Phosphorylierung oder Glycosylierung von Aminosäureseitenketten, und andere.

2.2 Die chemische Peptidsynthese

2.2.1 Historische Entwicklung

Wegen der fundamentalen Bedeutung der Proteine und Peptide in der Biologie hat die chemische Peptidsynthese eine lange Tradition. Bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts synthetisierte E. Fischer das Dipeptid Glycyl-glycin durch saure Hydrolyse von Diketopiperazin, also nicht aus den freien Aminosäuren. Kurze Zeit später gelang Fischer die erste „echte“ Peptidsynthese durch Umsetzung von α -Halogensäurechloriden mit Aminosäureestern [Fischer, 1902; Fischer, 1903]. Durch Verseifung des C-terminalen Esters und die Überführung der freien Säure in das Chlorid konnte die Synthese fortgesetzt werden. Das fertige Peptid ließ sich dann durch Ammonolyse des Halogenterminus mit Ammoniak bilden. Aufgrund der damals zur Verfügung stehenden Schutzgruppen mit nur unzureichenden Eigenschaften (siehe Kapitel 2.2.3) stieß diese Methode auf ihre synthetischen Grenzen. Erst durch die Einführung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe durch M. Bergmann und L. Zervas als selektiv spaltbare Schutzgruppe [Bergmann und Zervas, 1932] wurde die chemische Peptidsynthese deutlich leistungsfähiger. In der Folgezeit konnten mit Hilfe dieser und weiterer Schutzgruppen sowie durch andere neue Kopplungsverfahren wie der Mixedanhydrid-Methode (siehe Kapitel 2.2.4) die ersten biologisch aktiven Peptide synthetisiert werden, so z. B. 1953 das Peptidhormon Oxytocin aus neun Aminosäuren von V. du Vigneaud (Nobelpreis für Chemie 1955, [du Vigneaud et al., 1953]).

Als Vorteile der Synthese in Lösung sind die Reinigung der einzelnen Zwischenprodukte und die damit verbundene hohe Reinheit des Endproduktes sowie die homogene Reaktion zu nennen. Der erste Grund ist gleichzeitig der gravierendste Nachteil dieses Verfahrens, denn die Isolierung auf jeder Synthesestufe ist ein zeitlich und materiell aufwendiger Prozeß. R. B. Merrifield entwickelte in den sechziger Jahren die Synthese an festen polymeren Trägern

und verhalf damit der Peptidsynthese zum endgültigen Durchbruch [Merrifield, 1963; Merrifield, 1964]. Mittels des Aufbaus der Peptidkette an einem unlöslichen Träger konnte die Isolierung der Zwischenstufen durch einfache Filtration erreicht werden. Dadurch sank die Dauer für eine Synthese auf einen Bruchteil der Zeit einer Lösungssynthese, und die Peptide wurden schneller verfügbar. Für diese bahnbrechende Entwicklung erhielt Merrifield 1984 den Nobelpreis für Chemie. Seitdem hat die chemische Peptidsynthese durch viele Weiterentwicklungen auf den Gebieten der Schutzgruppen und Kopplungsmethoden sowie durch den Einsatz von Syntheseautomaten einen festen Platz in der modernen Biochemie eingenommen. Das Verfahren in Lösung wird heute allerdings fast nur noch bei speziellen Methoden wie Fragmentkopplungen oder Cyclisierungen sowie - aufgrund der hohen Kosten für den Träger - bei Synthesen im größerem Maßstab angewendet. Seit einigen Jahren findet die Festphasensynthese zunehmend auch Anwendung bei anderen Verbindungsklassen, z. B. bei der DNA-/RNA-Synthese [Merrifield, 1986] und in der kombinatorischen Chemie.

2.2.2 Festphasen-Peptidsynthese

Die Isolierung der Zwischenstufen von Nebenprodukten und nicht umgesetzten Edukten durch Chromatographie oder Kristallisation erfordert bei Synthesen in Lösung die meiste Zeit und den größten Aufwand. Folglich ist die Idee von Merrifield, das Peptid an einem festen unlöslichen Träger zu synthetisieren und damit die Trennung von den Reaktionslösungen durch simple Filtration zu erreichen, so einfach wie einleuchtend.

Als Trägermaterial dienen *Harze*, Kügelchen aus Polystyrol [Merrifield, 1963], Polyethylenglycol und anderen Kunststoffen oder Filterpapiere aus Cellulose [Lebl et al., 1991], um ein paar Beispiele zu nennen. Durch Co- oder Pfropfpolymerisation können aus zwei unterschiedlichen Bestandteilen Träger gebildet werden, in denen bestimmte Eigenschaften beider Einzelsubstanzen vereinigt sind [Rapp et al., 1988], wie die Polarität und das Quellverhalten in Lösungsmitteln. Die Oberfläche des Trägers ist mit funktionellen Gruppen belegt, an denen die Synthese durchgeführt wird.

Zwischen dem eigentlichen Träger und der Peptidkette befindet sich in der Regel ein weiterer Molekülabschnitt, der verschiedene Funktionen hat. Das Erreichen eines gewissen Abstandes des Peptids vom Träger führt durch erleichterte Diffusion zu einer besseren Zugänglichkeit der

wachsenden Kette und damit zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit. Ein Zwischenstück mit dieser Funktion wird als *Spacer* bezeichnet. Wichtiger ist jedoch meist die Einfügung eines sogenannten *Linkers*, eines Abschnitts mit einer spaltbaren Gruppe (Ester, Ether oder andere), durch die das fertige Peptid in verschiedener Art und Weise freigesetzt werden kann, z. B. als freie Säure [Atherton et al., 1981] oder als Säureamid [Rink, 1987], durch saure oder basische Spaltbedingungen. Für bestimmte Zwecke werden die Peptide am Träger gebunden eingesetzt, in dem Fall entfällt der Einsatz eines Linkers.

Der Aufbau der Peptidkette an der festen Phase (Abb. 2.1) erfolgt wie auch bei der Synthese in Lösung fast ausschließlich vom C- zum N-Terminus hin, da es bei der sonst notwendigen **Aktivierung** (s. Kap. 2.2.4) der Aminogruppe leicht zu Racemisierung am asymmetrischen α -C-Atom kommt. Die Reaktionssequenz, mit der eine Aminosäure an die wachsende Kette gehängt wird, besteht aus folgenden Schritten, die in den Kapiteln 2.2.3 und 2.2.4 ausführlicher dargestellt werden: Die **Entschützung** des N-Terminus der bereits am Träger synthetisierten Peptidkette setzt die Aminogruppe frei, ohne die Seitenkettenschutzgruppen abzuspalten (temporäre Schutzgruppen, s. Kap. 2.2.3.1). Die **Kopplung** der nächsten geeignet geschützten Aminosäure erfolgt mittels vorher oder *in situ* durchgeführter C-terminaler Aktivierung des Bausteins (s. Kap. 2.2.4). Durch quantitative Bestimmung der noch freien Aminogruppen auf dem Harz [Kaiser et al., 1970; Krchnak et al., 1988] kann eine Reaktionskontrolle durchgeführt und die Reaktionszeit bei Bedarf verlängert bzw. die Kopplung wiederholt werden (*Doppelkopplung*).

Diese Schritte werden einschließlich des notwendigen Waschens erneut durchlaufen, bis das Peptid am Träger vollständig aufgebaut ist. Durch die Wahl von universellen Reaktionsbedingungen zur Entschützung bzw. Kopplung aller Aminosäuren können die sich wiederholenden Umsetzungen oft komplett von Syntheseautomaten übernommen werden.

Nach Beendigung des Kettenaufbaus folgt die Spaltung der Seitenkettenschutzgruppen (permanente Schutzgruppen, s. Kap. 2.2.3.2) sowie bei Peptiden in löslicher Form die Abspaltung vom Träger mit anschließender Isolierung. Dabei steht mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) an *reversed phase*-Trennmateriale inzwischen ein sehr effektives Verfahren zur Verfügung, das die Reinigung von teilweise komplexen Produktgemischen, gerade bei längeren Peptiden, erleichtert oder erst möglich macht.

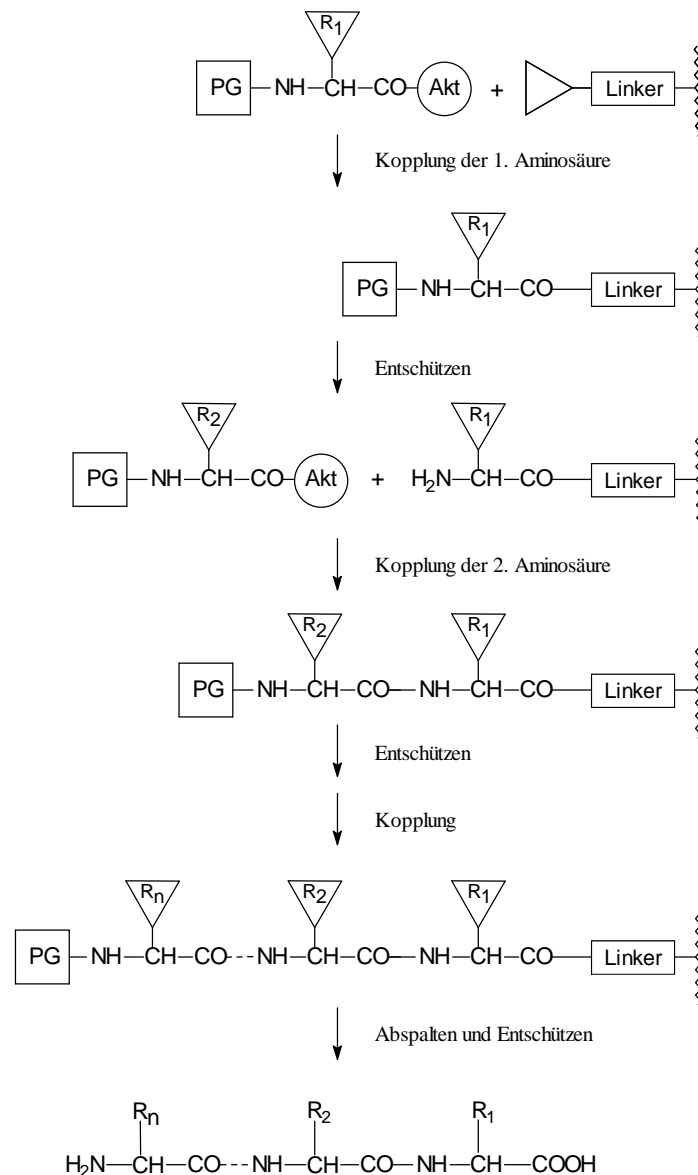


Abb. 2.1: Festphasenpeptidsynthese

Weitere wichtige Methoden zur Gewinnung reiner Peptide sind Kristallisation, Affinitätschromatographie oder Gelfiltration.

2.2.3 Schutzgruppen in der Peptidsynthese

Das folgende Kapitel befaßt sich mit den Grundzügen der Schutzgruppenmethodik und den wichtigsten Vertretern der unterschiedlichen Klassen von Schutzgruppen. Für eine ausführlichere Behandlung dieses Themas sei auf die umfassende Literatur hingewiesen [Bodanszki, 1993; Fields und Noble, 1990].

Die Notwendigkeit von Schutzgruppen in der Peptidsynthese wird deutlich, wenn die Möglichkeiten der Reaktion von zwei Aminosäuren A und B mit jeweils zwei funktionellen Gruppen, der Amino- und der Carboxylgruppe, betrachtet werden. Im ersten Schritt kann es neben den Reaktionen der Aminosäuren miteinander (Produkt A-B bzw. B-A) zur Dimerisierung der Aminosäuren kommen (Produkt A-A bzw. B-B). Mit jedem weiteren Schritt wächst die Zahl der möglichen Reaktionen exponentiell an. Da von dieser Vielzahl in der Regel nur eine Reaktion die gewünschte ist, müssen folglich alle Gruppen geschützt werden, die nicht reagieren sollen. Dabei sind die Anforderungen an die Schutzgruppen sowohl für die Synthese in Lösung als auch für die Synthese an fester Phase identisch.

Es werden generell zwei Klassen von Schutzgruppen unterschieden. Die *temporären* Schutzgruppen blockieren vorübergehend die Funktionalität im Molekül, die im folgenden Schritt mit der nächsten Aminosäure reagieren soll und so der Kettenverlängerung dient. Es sind dementsprechend Amino- oder Carboxylschutzgruppen. Wichtigste Eigenschaft dieser Gruppen ist die möglichst milde, vor allem aber selektive Abspaltung im Anschluß an die Kopplung, um Nebenreaktionen jeder Art zu minimieren.

Die *permanenten* Schutzgruppen an den Seitenketten und an dem nicht zu verlängernden Terminus des Peptids sollen während der ganzen Synthese intakt bleiben. Daher müssen sie unter den Bedingungen der Kopplungsreaktion sowie der Abspaltung der temporären Schutzgruppe stabil sein. Die permanenten Gruppen werden nach Beendigung der Synthese abgespalten und setzen die ursprüngliche Funktion wieder frei. Die dafür verwendeten Schutzgruppen sind so zahlreich und verschieden wie die zu schützenden Gruppen. Eine Gemeinsamkeit sollten jedoch alle derartigen Schutzgruppen aufweisen: Die Abspaltung sollte in einem Schritt, in der Festphasensynthese optimalerweise inklusive der Abspaltung vom Träger, erfolgen können, um die finale Entschützung weitestgehend zu vereinfachen. Dies ist insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Automatisierung des kompletten Ablaufs der Synthese an fester Phase von Vorteil. Durch diese Prämisse wird die Zahl der möglichen Abspaltmechanismen drastisch reduziert; als praktikabel hat sich dabei die Acidolyse erwiesen. Bei der Abspaltung ist entscheidend, daß keine weiteren Reaktionen an den Seitenketten oder den Peptidbindungen ablaufen dürfen. Zur Vermeidung dieser Nebenreaktionen werden den Abspaltlösungen oft sogenannte *Scavenger* zugesetzt, Substanzen wie zum Beispiel Thioanisol, Phenol oder Triethylsilan, die mit den bei der Entschützung gebildeten reaktiven Molekülen wie Carbeniumionen reagieren und sie abfangen.

2.2.3.1 Temporäre Schutzgruppen

Da die chemische Peptidsynthese, wie oben erwähnt, in C-nach-N-Richtung verläuft, sollen als temporäre Schutzgruppen hier die gebräuchlichsten Aminoschutzgruppen betrachtet werden.

Als erste derartige Schutzgruppe, die eine wirklich selektive Entschützung erlaubte, wurde 1932 die Benzyloxycarbonyl-Gruppe verwendet [Bergmann und Zervas, 1932]. Früher mit Cbz abgekürzt, wird sie heute meist nach einem ihrer Entwickler - Zervas - als Z-Gruppe bezeichnet. Sie gehört zur Klasse der Carbamate (Urethane) und kann durch katalytische Hydrierung oder Acidolyse abgespalten werden, wobei erstere Methode unter besonders milden und selektiven Bedingungen abläuft. In beiden Reaktionen wird der Benzylester gespalten, und in Folge zerfällt die entstehende instabile Carbaminsäure unter Kohlendioxid-Freisetzung zum Amin. Bei Festphasensynthesen führt die Verwendung eines festen Hydrierungskatalysators (meist Palladium auf Kohle) oft zu Problemen mit der Zugänglichkeit der zu entschützenden Gruppe. Zum Teil lagert sich der Katalysator auch auf dem Trägermaterial ab, was im Laufe der Synthese zu Nebenreaktionen führen kann. Daher wird die Z-Gruppe in der Festphasensynthese selten eingesetzt, in der Lösungssynthese ist sie ungleich weiter verbreitet. Die Einführung der Z-Gruppe wird am einfachsten durch Umsetzung der Aminosäure mit Chlorameisensäurebenzylester sowie Basenzusatz erreicht [Bergmann und Zervas, 1932].

Aus den erwähnten Gründen mußte bei der Entwicklung der Festphasensynthese eine neue Aminoschutzgruppe verwendet werden. Die ebenfalls zur Klasse der Carbamate gehörende *tert*-Butyloxycarbonylgruppe (**Boc**), von F. Mc Kay und N. Albertson entwickelt, ist gegen Basen und katalytische Hydrierung stabil, wird aber durch starke Säuren gespalten [Mc Kay und Albertson, 1957]. Unter Verwendung von z. B. 4 N HCl in Dioxan oder Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan zerfällt die Boc-Gruppe in das *tert*-Butylkation und die freie Carbaminsäure, letztere decarboxyliert analog zur Z-Gruppe. Das reaktive Carbokation muß zur Vermeidung von unerwünschten Nebenreaktionen mit nukleophilen *scavengern* abgefangen werden. Unter den Abspaltbedingungen liegt die Aminogruppe protoniert vor, so daß ein Neutralisationsschritt notwendig ist, um die Synthese fortzusetzen. Die Einführung der Boc-Gruppe erfolgt wegen der Instabilität des Reagenzes nicht durch Chlorameisensäure-*tert*-butylester (Boc-Cl), sondern durch die stabileren Anhydrid- [Pope et al., 1988] oder Azid-Derivate (Boc₂O bzw. Boc-N₃).

Eine von L. Carpino entwickelte weitere Aminoschutzgruppe aus der Klasse der Carbamate ist die Fluorenylmethyloxycarbonylgruppe (**Fmoc**) [Carpino und Han, 1970]. Im Gegensatz zur Boc-Gruppe ist sie säurestabil und wird durch Basen wie Piperidin (20 % in Dimethylformamid (DMF) oder 10 % in Methanol) gespalten. Mechanistisch liegt der Abspaltung eine β -Eliminierung zugrunde: Die Base abstrahiert das Proton H-9 des Fluorenylringssystems, es werden Dibenzofulven und aus dem entstehenden Carbamat Kohlendioxid eliminiert, und das freie Amin entsteht. Das Dibenzofulven bildet mit der protonierten Base ein UV-aktives Addukt und kann somit zur photometrischen Quantifizierung der vorher gebundenen Fmoc-Gruppen herangezogen werden.

Die Einführung der Gruppe erfolgt mit Chlorameisensäure-fluorenylmethyl-ester (Fmoc-Cl) oder dem O-Succinimid-Derivat (Fmoc-OSuc) in Wasser/Dioxan oder in Dichlormethan und Basenzusatz, z. B. Na_2CO_3 oder Diisopropylethylamin (DIEA) [Fields und Noble, 1990]. Nachteile der Fmoc-Gruppe sind die zum Teil schlechte Löslichkeit der Derivate in den verwendeten Lösungsmitteln sowie die bei Lösungssynthesen notwendige chromatographische Abtrennung der nicht flüchtigen Nebenprodukte bei der Entschützung.

2.2.3.2 Permanente Schutzgruppen

Während für bifunktionelle Aminosäuren in der Synthese eine temporäre Schutzgruppe ausreicht, wird für die trifunktionellen Aminosäuren neben dieser auch eine Schutzgruppe in der Seitenkette benötigt, die im Laufe des Peptidaufbaus intakt bleiben soll. Von diesem Konzept des globalen oder maximalen Schutzes wird jedoch in einigen Syntheseverfahren abgewichen, vor allem, wenn kurze Peptidketten für eine nachfolgende Fragmentkopplung (s. Kap. 2.2.5) synthetisiert werden sollen. Ein globaler Schutz minimiert dabei zwar die Gefahr von Nebenreaktionen, verringert aber gleichzeitig die Löslichkeit der Fragmente in polaren Lösungsmitteln. In solchen Fällen findet das Konzept des minimalen Schutzes Anwendung, in dem nur die Funktionen in den Seitenketten geschützt werden, bei denen der Schutz essentiell ist.

Damit während der Abspaltung der temporären Schutzgruppen die permanenten intakt bleiben, müssen sie eine der folgenden Eigenschaften besitzen: Entweder ist die Reaktivität der permanenten Schutzgruppen gegenüber den Abspaltbedingungen in ausreichendem Maße geringer oder sie werden durch einen anderen chemischen Mechanismus abgespalten. Im zweiten Fall

werden die Schutzgruppenklassen als *orthogonal* bezeichnet. Neben der bei Betrachtung der temporären Schutzgruppen erwähnten Acidolyse bzw. β -Eliminierung können weitere Abspaltmechanismen wie Hydrogenolyse oder lichtinduzierte Spaltung [Renil und Pillai, 1994] verwendet werden, um *drei-* oder *mehrdimensionale* Schutzgruppenkonzepte zu erzielen.

In der Festphasen-Peptidchemie hat sich als Schutz für die α -Aminogruppe die Fmoc-Gruppe neben der von Merrifield verwendeten Boc-Gruppe etabliert (*Fmoc-* bzw. *Boc-Taktik*). Deshalb werden im folgenden die Konzepte der permanenten Schutzgruppen bei diesen beiden temporären Schutzgruppen erläutert.

In der Boc-Taktik (Abb. 2.2) müssen die Schutzgruppen für die Seitenketten gegen starke Säuren stabil sein, um während der nach jeder Kopplung erforderlichen N-terminalen Entschützung nicht angegriffen zu werden. Dies trifft für Benzylester wie -ether zu, die daher bevorzugt verwendet werden. Durch Einführung von Substituenten am aromatischen Ring lässt sich die Säurestabilität nach Bedarf regulieren (*fine tuning*). Die permanenten Schutzgruppen werden wie der ebenfalls auf der Benzylgruppe basierende Linker mit sehr starken Säuren wie Trifluormethansulfonsäure TFMSA oder Fluorwasserstoff HF abgespalten. Diese drastischen Bedingungen bergen naturgemäß das Risiko von Nebenreaktionen, außerdem ist bei der Handhabung mit HF besondere Vorsicht geboten und die Benutzung von speziellen Apparaturen erforderlich. Aufgrund der Benzylgruppe als vorherrschender Schutzgruppe wird dieses Konzept oft als *Boc/Benzyl-Taktik* bezeichnet.

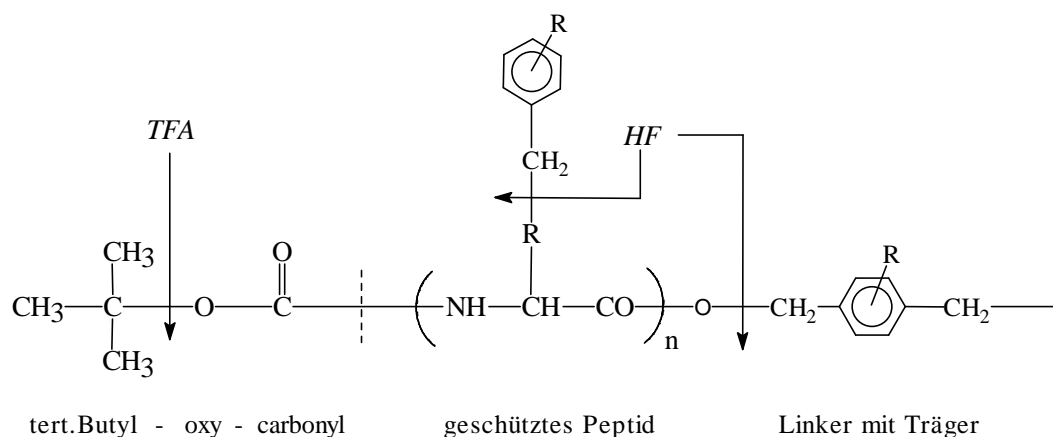


Abb. 2.2: Festphasenpeptidsynthese, Boc/Benzyl-Schutzgruppentaktik

Die Fmoc-Taktik (Abb. 2.3) ist dagegen ein orthogonales Konzept, folglich werden die permanenten Schutzgruppen nicht wie die Fmoc-Gruppe mit Base durch eine β -Eliminierung abgespalten. Als dazu orthogonaler Mechanismus bietet sich die Acidolyse an. Im Gegensatz zur

Boc/Benzyl-Taktik reichen hier jedoch starke Säuren wie TFA zur Abspaltung aus, wodurch die Gefahr von Nebenreaktionen deutlich geringer ist. Als Schutz für einige Aminosäuren bietet sich die *tert*-Butylgruppe in Form eines Esters bzw. Ethers an. Daher ist für dieses Konzept die Bezeichnung *Fmoc/tBu*-Taktik gebräuchlich. Als Linker werden p-Oxobenzylether-Derivate eingesetzt, die ebenfalls bei TFA-Behandlung zerfallen und somit das Peptid freisetzen.

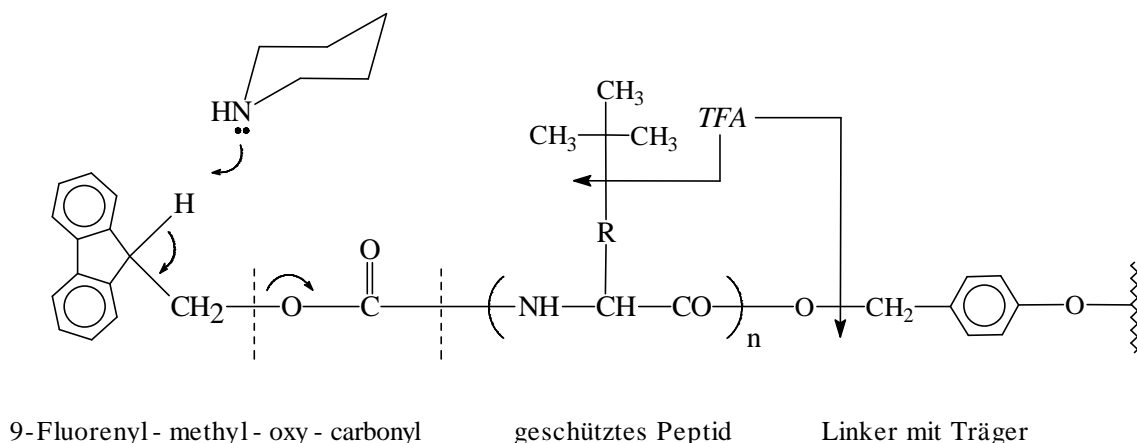


Abb. 2.3: Festphasenpeptidsynthese, Fmoc/*t*Bu-Taktik

2.2.4 Kopplung der Aminosäure

Formal betrachtet ist die Knüpfung einer Peptid- oder Amidbindung eine Kondensation einer Carbonsäure mit einem Amin unter Wasserbildung. Die direkte Reaktion läuft aber nur unter drastischen Bedingungen wie erhöhter Temperatur ab, was weitere, unerwünschte Reaktionen bedingen kann. Daher ist die Aktivierung, also die Umwandlung der zu koppelnden Aminosäure in ein energiereicheres reaktives Derivat erforderlich. In der Festphasenchemie (C-nach-N-Richtung) sind im Laufe der Zeit viele verschiedene Methoden zur Aktivierung des C-Terminus entwickelt worden (Abb. 2.4 und 2.5). Als eines der ersten Verfahren setzte T. Curtius die Azidmethode ein. Dabei wird die Aminosäure zuerst in das Hydrazid und anschließend in das Azid überführt [Curtius, 1902]. Wegen der geringen Racemisierungsgefahr hatte diese Variante lange Zeit Bestand und wird als Alternative gerade für spezielle Kopplungen wie Fragmentkondensationen gelegentlich noch eingesetzt. Ansonsten findet diese Methode wegen der Verwendung von Hydrazin nur noch selten Anwendung. Eine weitere Methode, die ebenfalls schon lange bekannt ist, besteht im Einsatz gemischter Anhydride der Aminosäure [Boissonnas, 1951; Wieland und Bernhard, 1951]. Durch Reaktion mit Dicyclohexyl- oder Diisopropylcarbodiimid (DCC bzw. DIC) mit der Aminosäure und einer weiteren Säure bzw. eines Carbonats

wird das entsprechende Anhydrid gebildet. Das entstehende Harnstoffderivat ist in den dabei verwendeten Lösungsmitteln unlöslich und wird vor der Kopplung abfiltriert.

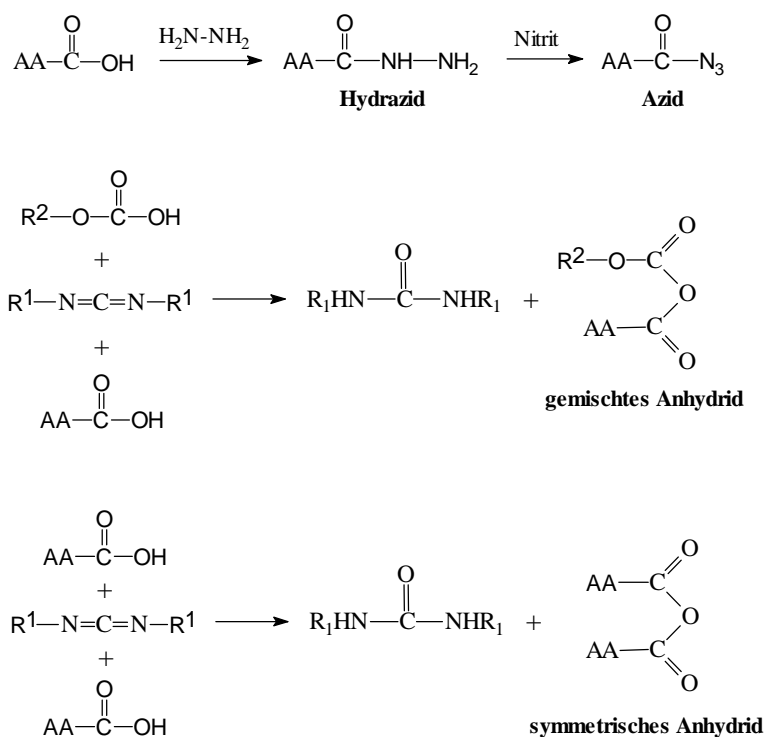


Abb. 2.4: Aktivierung der Aminosäuren als Azide, gemischte oder symmetrische Anhydride

Um eine Kopplung der nukleophilen Aminokomponente ausschließlich an den elektrophilen Aminosäureteil des Anhydrids zu gewährleisten, muß der nicht reagierende Teil durch Gruppen mit einem +I-Effekt in der Elektrophilie herabgesetzt werden. Zu umgehen ist dieses prinzipielle Problem durch die Verwendung des symmetrischen Anhydrids aus zwei Äquivalenten Aminosäure. Der entscheidende Nachteil der reaktiven symmetrischen Anhydride besteht darin, daß bei der Reaktion ein Äquivalent der Aminosäure nicht reagiert und aufwendig wieder gewonnen oder verworfen werden muß. Diese Methode eignet sich aufgrund dessen nur für die Kopplung von preiswerten Aminosäure-Derivaten.

Viel eleganter ist die Verwendung eines Aktivesters mit einer elektronenziehenden Gruppe. Dies erleichtert den nukleophilen Angriff des Aminostickstoffs der Peptidkette an den Carboxylkohlenstoff des Esters, erhöht so die Reaktionsgeschwindigkeit und verringert die Racemisierungsgefahr [Bodanszki et al., 1980]. Als Alkoholkomponente sind die stark elektronenziehenden p-Nitrophenyl- oder Pentafluorophenylgruppen gebräuchlich. Die Aktivester weisen in der Regel über längere Zeit Stabilität in der Lagerfähigkeit auf und können bei Bedarf ohne „vorgeschaltete“ Reaktion verwendet werden. Der Nachteil liegt insbesondere im kommerziellen Bereich in den höheren Kosten für die Aminosäuren.

Am häufigsten findet heute die *in situ*-Aktivierung Anwendung, bei der der Aktivester erst direkt vor bzw. während der Umsetzung aus der Aminosäure gebildet wird. Dies kann auf zwei Wegen erfolgen: Entweder reagiert die Aminosäure mit einem sogenannten „Hilfsnukleophil“ wie Hydroxybenzotriazol (HOBt) unter Mitwirkung eines Carbodiimids (über das symmetrische Anhydrid oder direkt) zu dem Benzotriazol-Ester (DIC/HOBt-Methode, [König und Geiger, 1973]), oder diese Umsetzung wird durch direkte Reaktion der Aminosäure mit einem Phosphonium- bzw. Uroniumderivat des Hydroxybenzotriazols (BOP bzw. TBTU) [Castro et al., 1975; Knorr et al., 1991] unter Mitwirkung eines tertiärenamins wie Diisopropylethylamin oder N-Methylmorpholin erzielt.

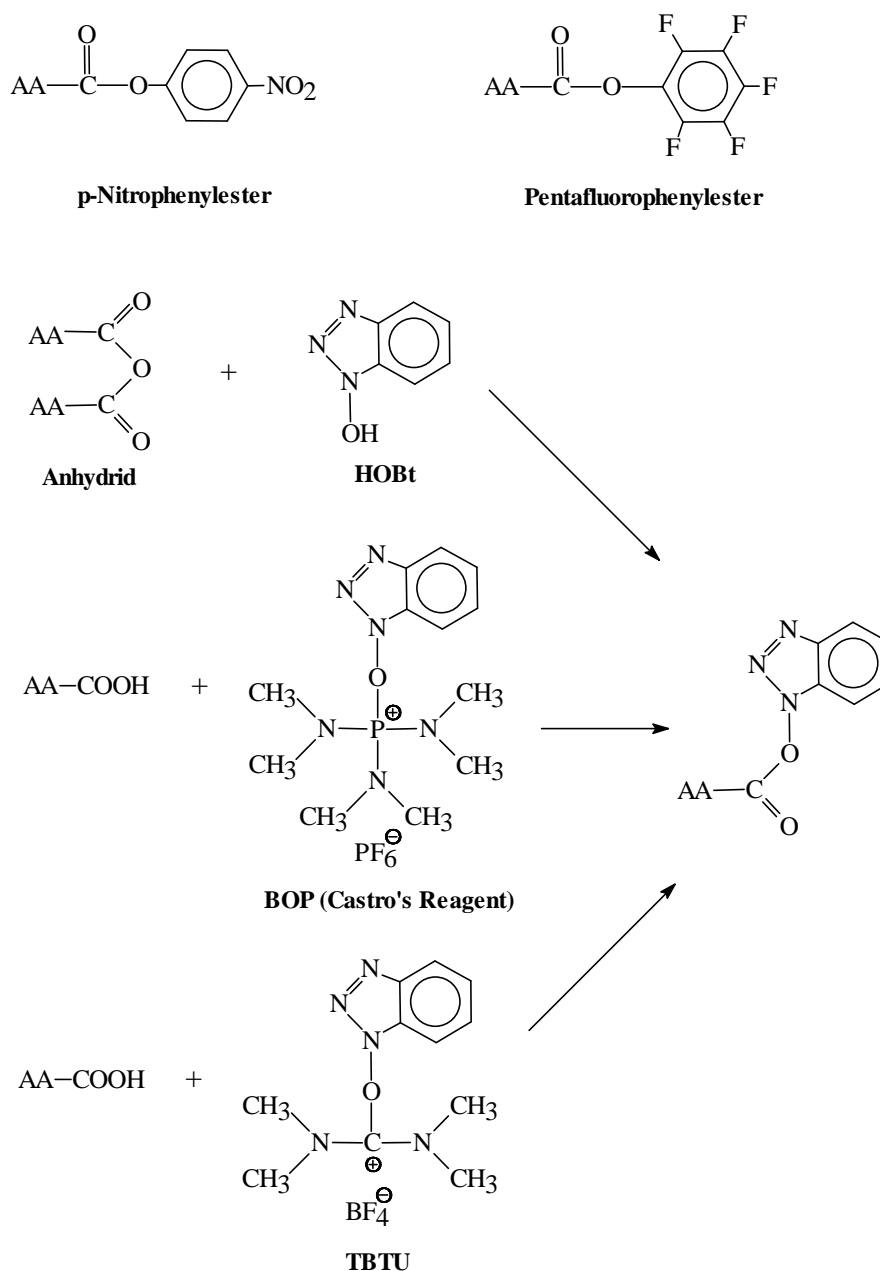


Abb. 2.5: Aktivierung der Aminosäuren als Aktivester bzw. HOBt-Ester

Von den beiden HOBt-Derivaten wurden in den letzten Jahren neue Varianten entwickelt, die verbesserte Kopplungsausbeuten auch mit sterisch stark gehinderten Aminosäuren, kürzere Reaktionszeiten sowie einen praktisch racemisierungsfreien Verlauf der Kopplung ermöglichen [Angell et al., 1994; Garcia-Echeverria, 1995]. Neben der Verwendung von Aktivestern ist dieses Verfahren wegen des geringen manuellen Aufwandes geradezu ideal beim Einsatz in der automatisierten Synthese.

Ein weiteres wichtiges Prinzip in der Festphasensynthese ist die Verwendung eines Überschusses an aktivierter Aminosäure, wodurch die Reaktion in Richtung Vollständigkeit getrieben wird [Merrifield, 1963]. Im Gegensatz zur Synthese in Lösung kann der nicht abreagierte Überschuß durch Filtration leicht vom gewünschten Produkt abgetrennt werden. In der Regel ist die bereits synthetisierte Peptidkette die wertvollere Substanz, weshalb drei bis vier Äquivalente der zu koppelnden Aminosäurespezies (z. B. *in situ*-aktivierte Aminosäure oder Anhydrid) eingesetzt werden.

Durch diese Verfahren sind Peptide in kurzer Zeit synthetisierbar. Die Dauer für die reine Synthese ohne Aufarbeitung liegt je nach Automaten und verwendeter Methoden typischerweise bei einer Stunde pro Aminosäure. Die Verkürzung der Synthesedauer hat zur Folge, daß die Reinigung des Rohpeptids inzwischen die meiste Zeit erfordert.

2.2.5 Synthesestrategien und Grenzen der Verfahren

Während die Synthesetaktik die Wahl der Schutzgruppen und der Kopplungsmethoden beinhaltet, legt die Synthesestrategie die Reihenfolge der Kopplungen fest. Die Strategie des linearen oder sequentiellen Aufbaus des Peptids sieht zunächst am einfachsten aus. Allerdings hat dieses Verfahren bei längeren Peptiden einen entscheidenden Nachteil: Bei einer angenommenen Kopplungsausbeute von 97 % pro Kopplung ist das gewünschte Peptid bei einer Länge von 30 Aminosäuren noch zu 40 % vorhanden, bei 70 Aminosäuren nur noch zu 12 %. Der Rest besteht aus Sequenzen, in denen eine oder mehrere Aminosäuren fehlen. Die Reinigung des gewünschten Produkts ist aufgrund der z. T. geringen Unterschiede in den Eigenschaften der Fehlsequenzen sehr schwierig. Daher wird die sequenzielle Festphasenpeptidsynthese heute nur bis zu einer Länge von ca. 30 Aminosäuren routinemäßig durchgeführt, darüber hinaus gehende Synthesen erfordern eine Optimierung der Kopplungsbedingungen Zeit, Kopplungsreagenz und Lösungs-

mittel. Falls die Kopplungsausbeuten durch die so verbesserten Verfahren nicht gesteigert werden können (was nur begrenzt möglich ist), müssen bei längeren Peptiden und kleineren Proteinen andere Strategien Anwendung finden. Bei der *Fragment-* oder *Segmentkopplung* wird das Zielpeptid in kleinere Abschnitte unterteilt, die durch sequenziellen Aufbau synthetisiert werden. Die Fragmente sind relativ leicht zu reinigen und führen durch Kopplung in Lösung oder am festen Träger [Mergler et al., 1989] zu dem gewünschten Peptid. Eine Schwierigkeit dabei ist wie bei Kopplungen allgemein die Racemisierung der zu aktivierenden Aminosäure. Folglich werden bevorzugt solche Aminosäuren als Schnittstellen ausgesucht, die keine oder geringe Racemisierungstendenzen aufweisen (Glycin, Prolin). Des weiteren ergibt sich oft ein Problem mit der Löslichkeit der permanent geschützten Peptide in den üblichen polaren Lösungsmitteln. Zur Bewältigung dieses Problems können unter anderem teilgeschützte Peptide (s. Kap. 2.2.3.2) sowie spezielle Lösungsmittel eingesetzt werden. Es gelang z. B. unter Verwendung der Lösungsmittelgemische Chloroform/Trifluoroethanol und Chloroform/Phenol die Synthese des 238 Aminosäure langen „green fluorescent proteins“ aus 26 vollgeschützten Fragmenten von ca. 10 Aminosäuren Länge [Nishiushi et al., 1998]. Diese durchaus hervorragenden Resultate dürfen jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, daß die Synthese langer Peptide keinesfalls Routine ist, sondern vielmehr jede derartige Synthese mit hohem Aufwand immer neu konzipiert und optimiert werden muß.

2.3 Phosphorylierte Peptide und Phosphatasen

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen durch Proteinkinasen bzw. Proteinphosphatasen sind wichtige posttranslationale Modifikationen. Vorwiegend die Hydroxyaminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin werden in der Weise verändert.

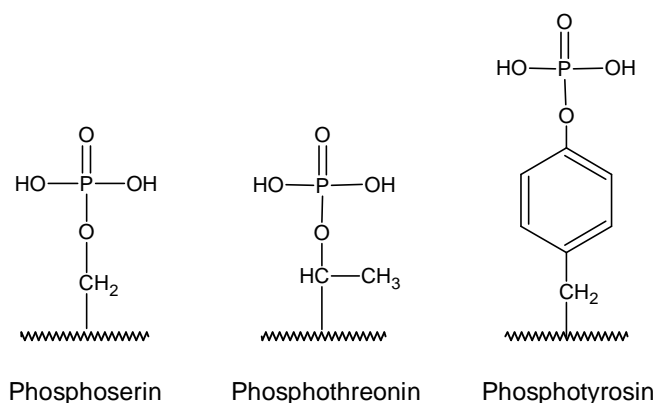


Abb. 2.6: Phosphatgruppen tragende Aminosäuren

Schätzungen gehen davon aus, daß etwa ein Drittel aller Proteine diese Reaktionen durchlaufen [Jia, 1997], und daß ca. 4 % des eukariontischen Genoms Kinasen und Phosphatasen kodieren [Hunter, 1995]. Dabei besteht ein starkes Ungleichgewicht in Bezug auf die Aminosäure: 90 % aller Phosphorylierungen finden am Serin statt, 10 % am Threonin [Sefton et al., 1980] und nur 0,1 % am Tyrosin. Jedoch spielen insbesondere die Phosphotyrosine in vielen wichtigen Mechanismen eine entscheidende Rolle [Hunter et al., 1988; Ullrich und Schlessinger, 1991].

Durch die Phosphorylierung ändern sich einige Eigenschaften der Proteine nicht unwesentlich. Unter physiologischen Bedingungen liegen beide Säuregruppen des Phosphats unprotoniert vor, es werden also bei der Phosphorylierung zwei negative Ladungen pro Phosphatrest in das Protein eingeführt. Da die Phosphorylierung an der Proteinoberfläche stattfindet, erhöht sich die Hydrophilie, und als Folge davon sinkt die Membrangängigkeit ab. Neben der allgemeinen Zunahme der Polarität kann der Phosphatrest Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und dadurch die Konformation des Proteins beeinflussen oder mit Aminosäureresten anderer Proteine Wechselwirkungen eingehen. Aufgrund der Wechselwirkungen kommt es z. B. zur phosphatabhängigen Auslösung eines Signals. Diese spezifische Erkennung des Phosphoproteins unter anderem mittels *SH2-domain* genannter Proteinregionen wird in vielen zellulären Mechanismen ausgenutzt, um Enzymaktivitäten zu regulieren. So phosphorylieren sich etliche Kinasen zunächst selber (Autophosphorylierung) und erhöhen damit ihre Aktivität deutlich. Beispiele dafür sind Insulinrezeptoren oder auch Wachstumsfaktor-Rezeptoren (*growth factor receptor*, GFR), die Tyrosinkinase-Domänen besitzen. In der Signalübertragung ist der Mechanismus der Regulation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung besonders bedeutend. In einer normalen Zelle besteht ein über die Enzymaktivitäten und -lokalisierung der Kinasen und Phosphatasen genau reguliertes Gleichgewicht beider Proteinformen, das sich z.B. durch ein Signal von außen für eine bestimmte Zeit verändert. Ist nun die Regulation eines Enzyms gestört, so ist das Gleichgewicht auf Dauer verschoben. Als Folge davon kann es u. a. zu übermäßigem Zellwachstum, d. h. zu Krebs kommen [Aaronson, 1991; Yarden und Ullrich, 1988]. Für wichtige Arbeiten zur Aufklärung der Bedeutung der Protein-Phosphorylierung erhielten E. Krebs und E. H. Fischer 1992 den Nobelpreis [Krebs und Fischer, 1993].

Phosphatasen gehören zu der Enzymklasse EC 3.1.3 der Phosphorsäuremonoesterhydrolasen. Sie setzen das Phosphat direkt als anorganisches Ion frei, übertragen es nicht wie Phosphotransferasen auf andere Moleküle. Bisher sind deutlich weniger Phosphatasen bekannt als Kinasen (ca. ein Viertel). Diese Diskrepanz läßt sich durch die unterschiedliche Spezifität erklären.

Kinasen sind in der Regel sehr spezifisch und phosphorylieren nur eine bestimmte von mehreren möglichen im Protein vorhandenen Aminosäuren. Dagegen haben Phosphatasen meist ein breites Substratspektrum, da die Spezifität nicht von so entscheidender Bedeutung ist. Es sind jedoch auch Phosphatasen mit hoher Spezifität bekannt. Aufgrund der Substrate bzw. Cofaktoren werden die Proteinphosphatasen (PP) in Gruppen eingeteilt. Ein Hauptunterscheidungsmerkmal ist die Natur der zu dephosphorylierenden Aminosäuren: Eine Klasse von Phosphatasen spaltet Tyrosinphosphate, die andere Serin- und Threoninphosphate. Durch den aromatischen Ring des Tyrosins, der mit dem aktiven Zentrum in Wechselwirkung tritt, ist eine gute Diskriminierung beider Substratgruppen durch beide Enzymklassen gegeben. Die Serin-/Threoninphosphatasen, bei denen zum Teil starke Unterschiede in der Aktivität gegenüber den Serin- bzw. Threoninphosphaten beobachtet wurden [Agostinis et al., 1990; Agostinis et al., 1987], werden noch weiter klassifiziert. So dephosphoryliert PP 1 die β -Untereinheit der Phosphorylase-Kinase, PP 2 dagegen die α -Untereinheit. Weitere Unterklassen der PP 2 ergeben sich aus der Abhängigkeit des Enzyms von Cofaktoren. Beeinflussen Polykationen die Aktivität der Phosphatase, so wird diese als polykationen-stimulierte Phosphatase PCS oder als Phosphatase PP 2A bezeichnet. Das Ca^{2+} -regulierte Enzym PP 2B ist auch unter dem Namen Calcineurin bekannt. Die PP 2C besitzt als Cofaktoren Mg^{2+} -Ionen. Neben den Proteinphosphatasen existieren noch diverse Phosphatasen, die ein saures bzw. basisches pH-Optimum aufweisen (saure bzw. alkalische Phosphatasen) und Proteine oder Peptide unspezifisch und langsam dephosphorylieren. Für eine umfassende Abhandlung der Ser/Thr-Phosphatasen sei auf die Literatur verwiesen [Cohen, 1989]. Obwohl die Proteinphosphatasen in vielen zellulären Abläufen von großer Bedeutung sind, war noch vor einigen Jahren relativ wenig über ihre Regulation im Detail, ihre Struktur sowie die molekularen Mechanismen der von ihnen katalysierten Reaktionen bekannt. Durch verstärkte Forschungen auf dem Gebiet konnten seitdem wichtige Erkenntnisse über ihre Struktur und die physiologische Funktion gewonnen werden [Barford et al., 1994; Mumby und Walter, 1993].

Wegen der großen Bedeutung, die Phosphoproteine in der Zellbiologie besitzen, besteht ein hoher Bedarf an artifiziellen Substraten und Inhibitoren für Kinasen und Phosphatasen. Geeignete Substrate sind durch die chemische Peptidsynthese leicht zugänglich, die Inhibitoren müssen nicht zwangsläufig Peptide sein. So inhibieren Vanadat-Verbindungen und der Polyether *Okadaic acid* die PP 2A in sequenz-unspezifischer Art und Weise [Hardie, 1993]. Sollen Phosphatasen, die unterschiedliche Substrate umsetzen, in ihrer Aktivität nur von einem dieser Peptide beeinflusst werden, so muß die Phosphatgruppe durch Analoga ersetzt werden, in denen

einzelne Atome ausgetauscht sind (Abb. 2.7). Dies führt zu Derivaten, die nicht oder zumindest langsamer hydrolysiert werden.

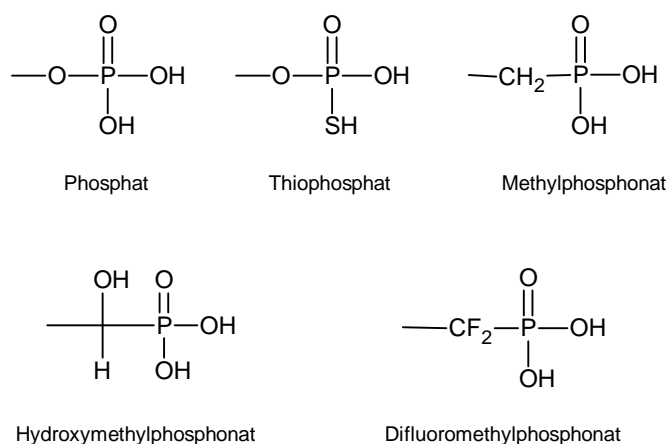


Abb. 2.7: Analoga der Phosphatgruppe

Das reguläre Phosphat besitzt den Vorteil, neben dem Einbau während der chemischen Synthese auch nachträglich und auf einfache Weise in Peptide eingebaut werden zu können. Dazu werden bei der enzymatischen Variante Kinasen verwendet, bei der chemischen Variante Phosphoramidite mit anschließender Oxidation [Bannwarth und Trzeciak, 1987]. Zur Isotopenmarkierung mit ^{32}P sind beide Möglichkeiten verwendbar. Phosphate sind zwangsläufig nicht hydrolysestabil.

Auch das Thiophosphat, in dem eine OH-Gruppe der Phosphorsäure durch -SH ersetzt ist, kann durch diese Varianten unter Verwendung der Thioderivate (γ -Thio-ATP bzw. Schwefelübertragungsreagenzien) nachträglich in Peptide eingeführt werden. Die Thiophosphat-Derivate besitzen eine höhere Stabilität gegenüber Phosphatasen, die aber oft nicht ausreichend ist [Kitas und Bannwarth, 1992]. Demnach steht der benötigte Aufwand für die Synthese in keinem günstigen Verhältnis zum erzielten Nutzen. Allerdings entspricht das Thiophosphat von den physiko-chemischen Eigenschaften her recht gut dem Phosphat.

Wird das Sauerstoffatom zwischen Phosphor und Aminosäure durch eine Methylgruppe ersetzt, so ist dieses Phosphonat nicht mehr hydrolysierbar. Ein Nachteil besteht jedoch darin, daß Phosphonate nicht nachträglich in Peptide inkorporiert werden können. Zur Einführung muß eine Aminosäure mit dieser Gruppe synthetisiert und in das Peptid eingebaut werden. Soll radioaktiver Phosphor verwendet werden, so nimmt der ohnehin hohe Aufwand noch zu. Weiterhin besitzt die Phosphonatgruppe durch den Austausch veränderte Eigenschaften wie den

höheren pK_2 -Wert von 7,1 statt 5,7 für das Phosphat [Domchek et al., 1992] bzw. 7,7 statt 6,2 [Smyth et al., 1992] oder die geringere Möglichkeit, Wasserstoffbrücken auszubilden. Dadurch kann die Affinität des Phosphopeptids zum Enzym im Vergleich zum Phosphat reduziert sein [Domchek et al., 1992] bzw. kann das Derivat keine inhibitorischen Eigenschaften besitzen [Chen et al., 1995].

Aus den Phosphonaten durch Substitution in der Methylgruppe abgeleitet sind die Hydroxy- sowie die Monofluoro- und Difluoro-methylphosphonate. Sie sind ebenfalls hydrolysebeständig und müssen auf gleiche Weise bei der Synthese über die entsprechenden Aminosäuren in ein Peptid eingebaut werden. Durch die Einführung der elektronenziehenden Gruppen -OH oder -F liegt der pK_2 -Wert von 5,7 im Gegensatz zu den Methylphosphonaten niedriger und entspricht annähernd dem des regulären Phosphats mit 6,2 [Smyth et al., 1992]. Auch die Möglichkeit zur Wasserstoffbrückenbildung ist diesem ähnlich. Damit sollten die entsprechenden Aminosäure- bzw. Peptidderivate im Vergleich zu den unsubstituierten Phosphonaten höhere Affinitäten zu Enzymen oder Rezeptoren bei ähnlicher Stabilität besitzen. Dies sollte auch in der inhibitorischen Wirkung deutlich werden.

Es zeigte sich, daß die diversen Analoga als Aminosäuren oder eingebaut in Peptide sehr unterschiedliche inhibitorische Eigenschaften aufweisen (Abb. 2.8).

Die inhibitorische Konstante K_i (s. Kap. 2.4.3) im Falle der Inhibierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase durch ein serin-analoges Methylphosphonat-Peptid beträgt 9 μM [Yang et al., 1994]. Diese gute Inhibitionsfähigkeit des Methylphosphonats ist dagegen bei Phosphatasen deutlich schlechter ausgeprägt: Der IC_{50} -Wert, der die Konzentration an Inhibitor angibt, bei der die Restaktivität des Enzyms 50 % beträgt, liegt bei Calcineurin und einem serin-analogen Methylphosphonat-Peptid über 100 μM [Shapiro et al., 1994], bei der *human T-cell*-Proteintyrosinphosphatase (TC-PTP) und einem tyrosin-analogen Methylphosphonat-Peptid über 400 μM [Ruzza et al., 1995]. Die schlechte Inhibition in den letzten beiden Fällen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die oben erwähnten veränderten Bindungseigenschaften zurückzuführen. Da jedoch auch die Sequenz des Peptids sowie die Struktur des Enzyms die Bindung des potentiellen Inhibitors an das Enzym beeinflussen, ist eine verlässliche Voraussage der Eigenschaften der Phosphat-Analoga generell nicht möglich.

Die Verwendung eines tyrosin-analogen Hydroxyphosphonats in einem Peptid zur Inhibierung der Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinase ergab einen IC_{50} -Wert von 20 μM , wobei der Inhibitor in einem Diastereomerenmisch vorlag [Kim et al., 1994]. Es ist aufgrund der oft sehr hohen

Stereospezifität von enzymkatalysierten Umsetzungen eine durchaus realistische Annahme, daß ein gereinigtes Isomer eine deutlich bessere inhibitorische Wirkung zeigt.

Die bisher besten Werte für die Inhibition von Phosphatasen durch Phosphatanaloga konnten mit Difluoromethylderivaten erzielt werden. So beträgt der K_i -Wert eines Peptids mit der entsprechenden tyrosin-analogen Aminosäure bei Inhibition der Protein-Tyrosinphosphatase PTP 1 mit $0,18 \mu\text{M}$ das 10^{-3} fache des Methylphosphonat-Peptids, ist also 10^3 mal wirksamer [Chen et al., 1995].

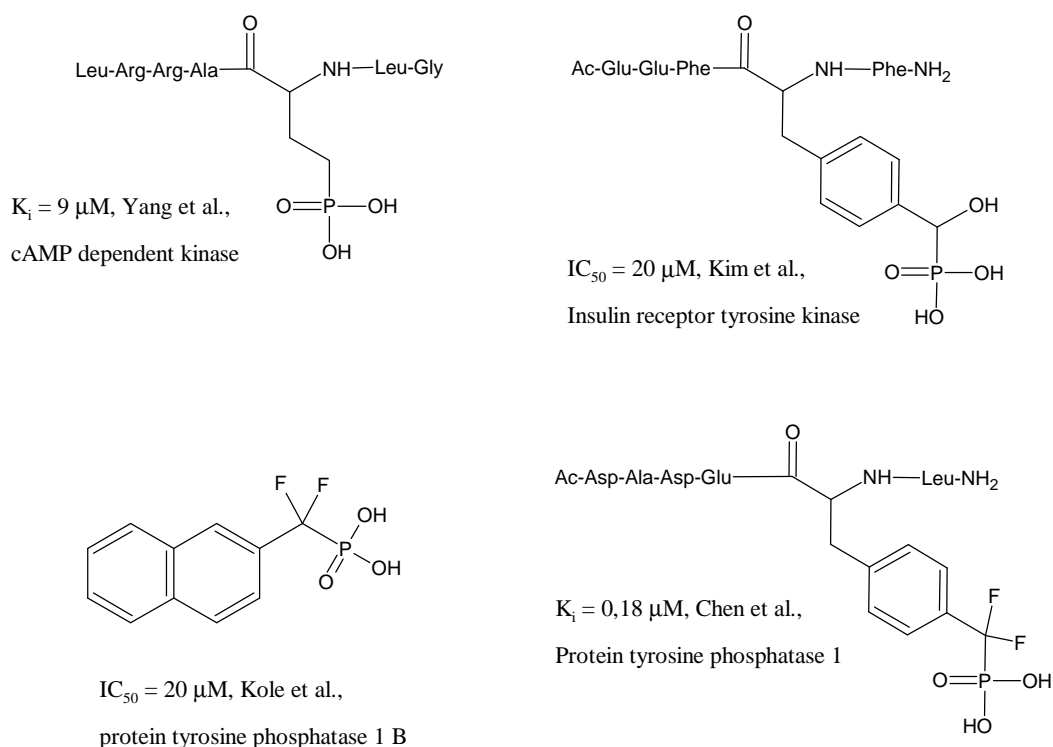


Abb. 2.8: Inhibitoren für Kinasen und Phosphatasen auf Phosphonatbasis

In einer systematischen Untersuchung von an Aromaten gebundenen Phosphonatgruppen als Inhibitoren für die Phosphatasen PP 1, PP 2A und PTP 1B wurde als Tendenz deutlich, daß Fluoromethyl-Derivate bessere Inhibitoren sind als Hydroxymethyl- oder Methylphosphonat-Derivate [Kole et al., 1995]. Dabei wurden die Serin-/Threonin-Phosphatase PP 2A und die Tyrosinphosphatase PTP 1B mit guter Wirkung inhibiert (IC_{50} im Bereich um $50 \mu\text{M}$), die PP 2A auch von mehreren Derivaten; die PP 1 dagegen von keinem der untersuchten Derivate.

Ein gravierender Nachteil der erwähnten Derivate als pharmakologisch verwendbare Stoffe ist die erschwerte Aufnahme in intakte Zellen. Um biologisch wirksam zu sein, muß die Phosphat- bzw. Phosphonat-Gruppe mit freien Säurefunktionen vorliegen. Bei physiologischem pH liegen die beiden Säurefunktionen des Phosphats bzw. Phosphonats als Anionen vor, dadurch ist die

Membrangängigkeit der entsprechenden Peptide stark verringert. Dadurch kann in der Regel keine Wirkung mehr erzielt werden. Eine mögliche Lösung des Problems ist die Verwendung von Substanzen, sogenannten *prodrugs*, die erst im Körper bzw. an der beabsichtigten Wirkungsstelle in die eigentlich pharmakologisch aktive Verbindung umgesetzt werden. Für eine derartige *Maskierung* der Phosphor- oder Phosphonsäuregruppierungen bietet sich der Gebrauch von Estern an. Diese sind als neutrale hydrophobe Spezies von Zellen gut aufnehmbar und können durch ubiquitär vorhandene Esterasen in die freien Säuren überführt werden [Mitchell et al., 1992; Saperstein et al., 1989; Schultz et al., 1993]. Bei der Einführung der Ester in Peptide kann es allerdings zu Problemen mit der Löslichkeit der Edukte bzw. Produkte kommen.

Ein generelles Problem bei der Verwendung von Peptiden als Pharmaka ist die Hydrolyse der Peptide durch Proteasen. Auch aus diesem Grund ist die *in vivo*-Anwendung der Derivate zumindest zweifelhaft.

Erwähnt werden sollen neben diesen Substratanaloga noch die „Selbstmord“-Inhibitoren. Dabei handelt es sich um Verbindungen, die erst durch das Enzym in reaktive Formen umgewandelt werden, welche dann mit Aminosäuren des aktiven Zentrums reagieren und es dadurch irreversibel inaktivieren [Cushman et al., 1990; Myers und Widlanski, 1993].

Proteine und Peptide, die Phosphatanaloga in ihrer Sequenz aufweisen und inhibitorisch wirken, werden zum Studium der Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse verwendet. Sie können gezielt Enzyme in ihrer Aktivität herabsetzen oder ausschalten, die diese Prozesse katalysieren oder die als Regulatoren andere Mechanismen beeinflussen. Die Inhibitoren lassen sich daneben auch einsetzen, um eventuell vorhandene entsprechende Kreuzaktivitäten von Enzymen anderer Enzymklassen zu unterdrücken. Werden von einem Enzym mehrere Substrate im Rahmen eines Wirkmechanismus umgesetzt, so läßt sich durch die Verwendung des entsprechenden Analogen mit ähnlicher Affinität die Umsetzung dieses Substrates spezifisch inhibieren, ohne die Wirkung auf die übrigen Substrate zu verändern.

Neben der Regulation von Phosphatasen und Kinasen lassen sich die hydrolysestabilen Phosphatderivate als Liganden mit hoher Affinität zu diesen Enzymen entwickeln. So ist eine Verwendung in der Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie denkbar. Dazu wird das entsprechende Derivat an ein Trägermaterial gekoppelt und dient auf diese Weise immobilisiert

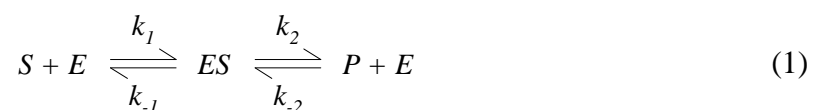
zur Isolierung der Enzyme aus Proteingemischen oder Zellaufschlüssen. So ist über die physiologische Funktion und Wirkweise der Proteinphosphatase 2C wenig bekannt, was auf das Fehlen eines für diese Phosphatase spezifischen Inhibitor zurückzuführen ist. Bisher wurden die diversen Isoformen des Enzyms mit unspezifischen Trennverfahren wie der Gelfiltration gereinigt. Ein immobilisierter Inhibitor würde die Gewinnung des Enzyms stark vereinfachen und weitere Untersuchungen zur Funktion erleichtern. Eine weitere Verwendung ist die gezielte Markierung von Enzymen mit radioaktiven oder fluoreszierenden Substratderivaten, um sie zu detektieren oder zu reinigen.

2.4 Enzymkinetik

2.4.1 Theorie der Enzymkinetik nach Michaelis-Menten

Die Kinetik einer Reaktion befaßt sich mit dem zeitlichen Verlauf der Umsetzung. Durch Anwendung von mathematischen Methoden auf beobachtete Meßwerte lassen sich charakteristische Größen der Umsetzung bestimmen. Anhand dieser Größen können Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus und die Stöchiometrie gezogen werden bzw. postulierte Annahmen validiert werden. Die beobachteten Meßwerte sind in der Regel Konzentrationen einer durch die Reaktion gebildeten bzw. umgesetzten Komponente.

Bei der durch ein Enzym katalysierten Reaktion kann zunächst folgender Mechanismus aufgestellt werden:



In einem vorgelagerten Gleichgewicht bildet sich ein Enzym-Substrat-Komplex aus den frei vorliegenden Molekülen. Der Quotient k_{-1}/k_1 ist dabei die Dissoziationskonstante des Komplexes, der in einem zweiten Gleichgewicht zu dem Produkt abreagiert.

Es wird von folgenden Annahmen ausgegangen: Zu Beginn der Reaktion ist die Produktkonzentration $[P]$ vernachlässigbar klein und die Geschwindigkeitskonstante k_{-2} für die Rückreaktion des Produktes aufgrund der angenommenen Irreversibilität der Umsetzung gleich Null. Des weiteren ist die Substratkonzentration $[S]$ gegenüber der Enzymkonzentration $[E]$ so groß, daß der Anteil des enzymgebundenen Substrates ebenfalls vernachlässigbar ist.

Die Konstanten k_1 und k_{-1} sowie k_2 sind für diese Reaktion charakteristisch, wobei in der Regel

gilt: $k_1 \sim k_{-1} \gg k_2$, letztere aber nicht vernachlässigt werden kann. Nach dem Massenwirkungsgesetz gelten für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes und des Produkts folgende Differentialgleichungen:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [S] [E] - (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (2)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] . \quad (3)$$

Die Einstellung des ersten Teilgleichgewichts ist in sehr kurzer Zeit abgeschlossen. Die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ändert sich effektiv nicht mehr, da der durch die Reaktion zum Produkt umgesetzte Anteil des Komplexes sofort unter erneuter Einstellung des ersten Gleichgewichts nachgebildet wird. Das Differential (2) wird gleich Null, es liegt ein *Fließgleichgewicht* (engl. *steady state*) vor. Daraus ergibt sich

$$k_1 [S] [E] = (k_{-1} + k_2) [ES] . \quad (4)$$

Da die Konzentration des freien Enzyms über die Gleichung

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (5)$$

mit der Gesamtkonzentration des Enzyms verknüpft ist, kann die Gleichung (4) nach [ES] aufgelöst werden:

$$[ES] = \frac{k_1 [S] [E_0]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]} . \quad (6)$$

Durch Einsetzen in Gleichung (3) und Kürzen durch k_1 ergibt sich für die Produktbildung über die Zeit die Reaktionsgeschwindigkeit

$$v = \frac{dP}{dt} = \frac{k_2 [E_0] [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} . \quad (7)$$

Die drei Geschwindigkeitskonstanten im Nenner werden zu einer zusammengefaßt, die als Michaelis-Konstante K_M bezeichnet wird:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} . \quad (8)$$

Die Gleichung (7) kann durch die Zusammenfassung von $k_2 \cdot [E_0] = V_{\max}$ zu einem Ausdruck weiter vereinfacht werden, der die für diese Reaktion maximal erreichbare Geschwindigkeit festlegt. Liegt die gesamte Enzymmenge als Enzym-Substrat-Komplex vor ($[ES] = [E_0]$), so ist die Produktbildung nach Gleichung (3) von der Geschwindigkeitskonstante k_2 und der Gesamt-enzymkonzentration $[E_0]$ abhängig. Es wird für die Reaktionsgeschwindigkeit folgender Ausdruck erhalten

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}, \quad (9)$$

der als *Michaelis-Menten-Gleichung* bezeichnet wird und die Abhängigkeit der Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion von der Substratkonzentration bei festgelegter Enzymmenge angibt. L. Michaelis und M. Menten stellten 1913 eine Beziehung für derartige Gleichgewichte auf, die 1925 von G. Briggs und J. Haldane zu der vorliegenden Gleichung (9) erweitert wurde [Briggs und Haldane, 1925; Michaelis und Menten, 1913].

Es sind folgende Sonderfälle der Michaelis-Menten-Gleichung zu beachten: Ist $[S] \ll K_M$, so kann $[S]$ im Nenner von Gleichung (9) vernachlässigt werden und es folgt

$$v = [S] \frac{V_{\max}}{K_M}, \quad (10)$$

die Geschwindigkeit ist somit linear von der Substratkonzentration abhängig (Reaktion 1. Ordnung). Für den umgekehrten Fall $K_M \ll [S]$ gilt

$$v = V_{\max}, \quad (11)$$

die Geschwindigkeit ist konzentrationsunabhängig, was einer Reaktion 0. Ordnung entspricht. Die diesen Grenzfällen entsprechende Kurve im $[S]/v$ -Diagramm ist die Hyperbel.

Beträgt die Geschwindigkeit $v = V_{\max}/2$, so ergibt sich nach Einsetzen in Gleichung (9) und Umformen die Beziehung $K_M = [S]$. Daraus folgt, daß die Michaelis-Menten-Konstante aus der kinetischen Messung der Reaktionsgeschwindigkeit v in Abhängigkeit von der Substratkonzentration $[S]$ ermittelt werden kann. Bei hoher Substratkonzentration nähert sich die Reaktionsgeschwindigkeit dem Grenzwert V_{\max} an. Der K_M Wert ergibt sich aus der Substratkonzentration, bei der die Geschwindigkeit halbmaximal ist. K_M kann aus V_{\max} durch Division durch die Gesamt-enzymkonzentration $[E_0]$ ermittelt werden und trägt die Bezeichnung *katalytische Konstante* k_{cat} .

2.4.2 Auswertung der Daten

Die Auswertung kinetischer Messungen erfolgt durch mathematische Analyse der beobachteten Daten. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird am Beginn der Umsetzung als v_0 ermittelt, da in dem Zeitraum eine quasi-lineare Abhängigkeit der Produktbildung von der Zeit besteht. Dieses Verfahren liefert in Bezug auf Genauigkeit und Bestimmbarkeit die verlässlichsten Ergebnisse. Es wird v_0 für mehrere Substratkonzentrationen $[S]$ bei konstanter Gesamt-Enzymkonzentration $[E_0]$ bestimmt. Die Ermittlung der Konstanten K_M und V_{\max} ist bereits aus den Meßwerten möglich, das Auftragen der Daten in Diagrammen führt zur verbesserten Anschaulichkeit der Ergebnisse und zu Aussagen über die Exaktheit der Werte bzw. zum Erkennen von Abweichungen von der Theorie. Es folgen die gebräuchlichsten Diagrammtypen einschließlich der mathematischen Grundlagen nach [Bisswanger, 1979].

2.4.2.1 Direkte Auftragung

Die direkte Auftragung (Abb. 2.9) der Meßwerte v über $[S]$ führt zu dem *Michaelis-Menten-Diagramm*. Die Punkte beschreiben bei Gültigkeit der Gleichung (9) eine Hyperbel, deren obere Asymptote V_{\max} entspricht. K_M wird an der Stelle der halbmaximalen Geschwindigkeit bestimmt. Entscheidender Nachteil dieser Auftragung ist die Schwierigkeit der Asymptotenbildung, die relativ ungenau ist. Dadurch ist auch der Fehler bei beiden Konstanten hoch.

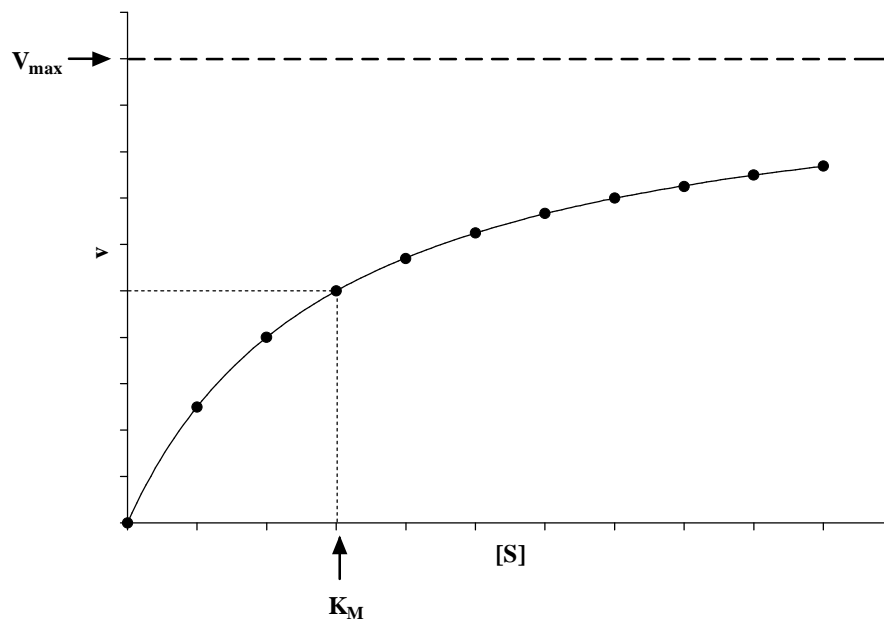


Abb. 2.9: Enzymkinetik, direkte Auftragung

Besser geeignet sind Auftragungen, die im Idealfall eine Gerade ergeben, da die Berechnung einer Ausgleichsgeraden durch die realen Meßpunkte einfacher durchzuführen und Abweichungen vom idealen Verhalten deutlicher zu erkennen sind.

2.4.2.2 Lineweaver-Burk-Diagramm

Die Kehrwertbildung aus Gleichung (9) führt zu

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (12)$$

Bei der Auftragung von $1/v$ über $1/[S]$ entspricht die Steigung der theoretischen Geraden dem Quotienten K_M/V_{\max} , der y-Achsenabschnitt $1/V_{\max}$ und der x-Achsenabschnitt $-1/K_M$ [Lineweaver und Burk, 1934]. Die Auftragung (Abb. 2.10) ist aufgrund der Einfachheit der Erstellung in der Literatur am weitesten verbreitet, was im Zirkelschluß dazu führt, daß neue Ergebnisse ebenfalls nach diesem Verfahren ausgewertet werden. Über 90 % der kinetischen Daten sind dementsprechend so dargestellt, obwohl diese Form mit einer großen Fehlerquelle behaftet ist: Im Bereich kleiner Substratkonzentrationen (im Diagramm rechts) liegen die Meßpunkte weit auseinander, so daß die Werte selber und auch ihre Abweichungen durch Pipettierfehler oder kleine und damit ungenaue Meßwerte bei der Bestimmung der Ausgleichsgeraden überbewertet werden.

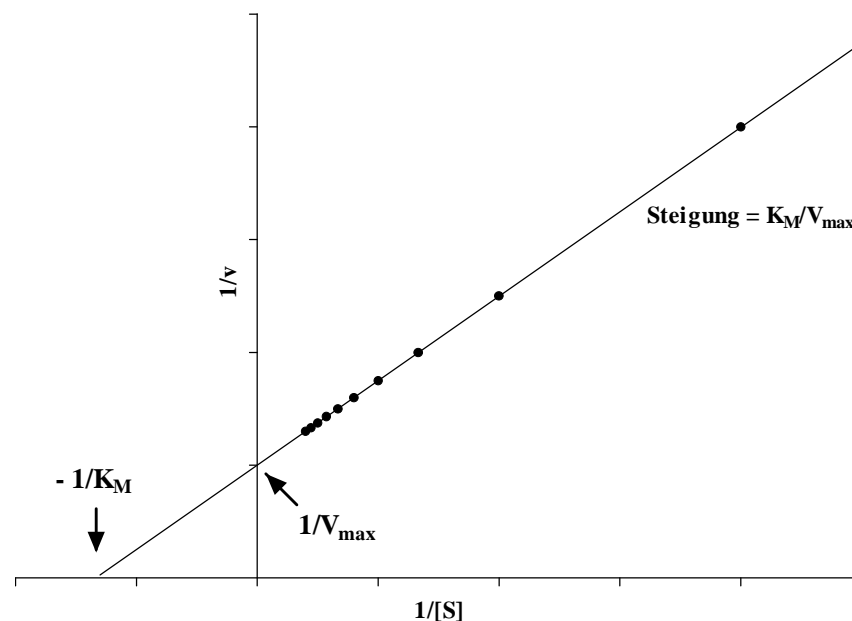


Abb. 2.10: Enzymkinetik, Auftragung nach Lineweaver-Burk

2.4.2.3 Hanes-Diagramm

Durch Multiplikation von (12) mit der Substratkonzentration [S] wird die Gleichung

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}} \quad (13)$$

erhalten. Die Auftragung von $[S]/v$ über [S] liefert als Steigung $1/V_{\max}$, als y-Achsenabschnitt K_M/V_{\max} und als x-Achsenabschnitt $-K_M$ [Hanes, 1932]. Da im Diagramm (Abb. 2.11) die Auftragung von [S] linear ist, wird im Gegensatz zu 2.4.2.2 kein Konzentrationsbereich überbewertet. Ein Nachteil dieser Form ist der Einfluß eines Meßwertes (hier [S]) auf beide Achsen, so daß dessen Fehler in beide Koordinaten der Meßpunkte eingehen. Da in der Regel die Einhaltung der Substratkonzentration genauer ist als die Durchführung der Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit, kann dieser Fehler oft vernachlässigt werden.

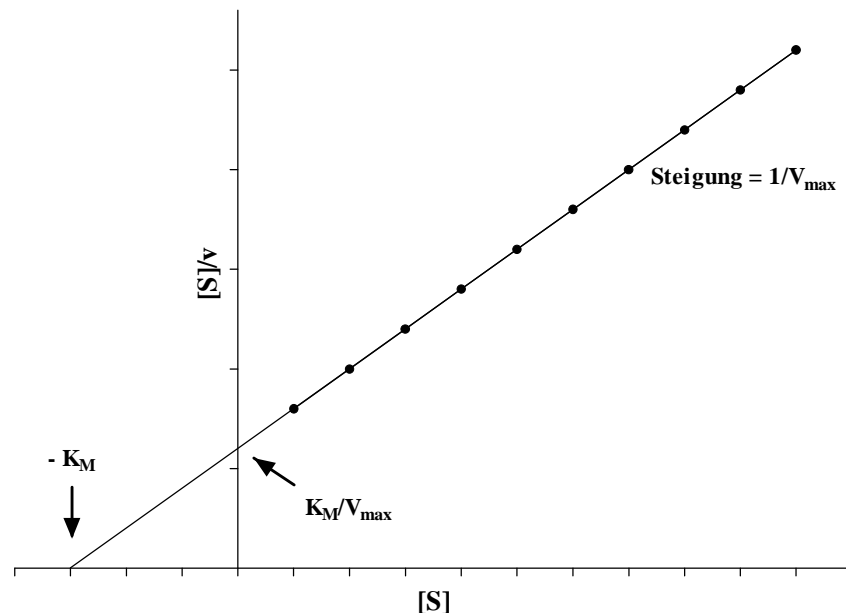


Abb. 2.11: Enzymkinetik, Auftragung nach Hanes

2.4.2.4 Eadie-Hofstee-Diagramm

Wird (12) mit $v \cdot V_{\max}$ multipliziert, so ergibt sich

$$v = - \frac{K_M v}{[S]} + V_{\max} .$$

Bei Auftragung von v über $v/[S]$ ergeben sich als Steigung $-K_M$, als y-Achsenabschnitt V_{\max} und

als x-Achsenabschnitt V_{\max}/K_M [Eadie, 1942]. Wie auch bei der Auswertung 2.4.2.3 geht in dem Diagramm (Abb. 2.12) ein Meßwert (hier v) in beide Koordinaten ein. Der Fehler dieses Meßwertes ist systembedingt höher als der der Substratkonzentration, damit die Genauigkeit der Ergebnisse bei der Eadie-Hofstee-Auftragung niedriger als bei der Methode nach Hanes.

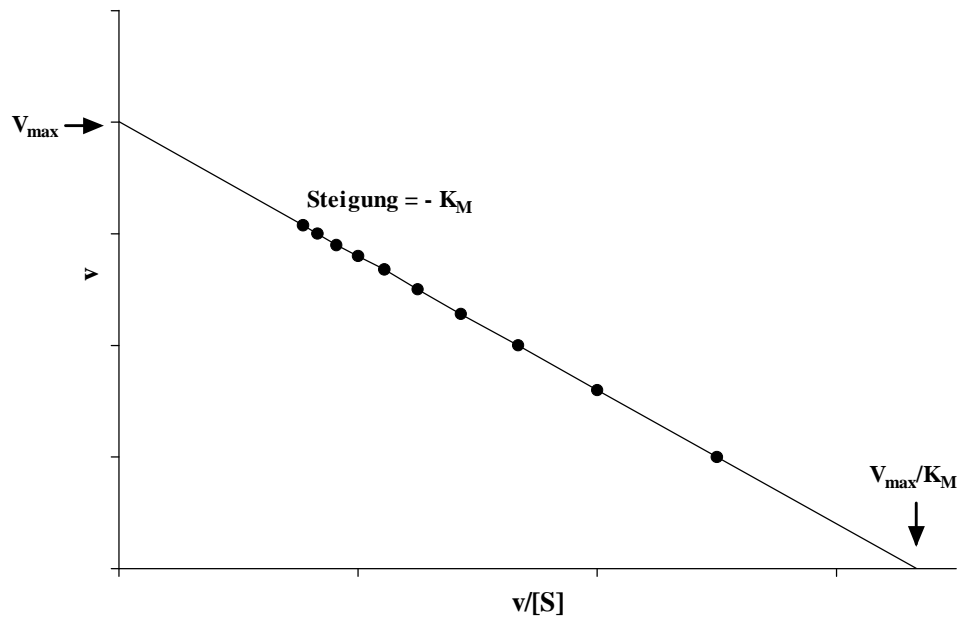


Abb. 2.12: Enzymkinetik, Auftragung nach Eadie-Hofstee

2.4.3 Kompetitive Inhibition von Enzymen

Bei diesem Hemmtyp bildet der Inhibitor nur mit dem freien Enzym einen Komplex und entzieht es damit dem zur Reaktion führenden Vorgleichgewicht. Die Gleichgewichtskonstante dieser Konkurrenzreaktion wird als Inhibitorkonstante K_i bezeichnet und ist definiert durch

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} . \quad (15)$$

Die Gleichung (5) für die Konzentration des freien Enzyms muß folglich um $[EI]$ ergänzt werden:

$$E = \frac{[E_0] - [ES]}{1 + I/K_i} . \quad (16)$$

Dieser Ausdruck in Gleichung (4) eingesetzt und nach $[ES]$ aufgelöst ergibt

$$[ES] = \frac{k_1 [S] [E_0]}{(k_{-1} + k_2)(1 + [I]/K_i)} \quad (17)$$

und weiterführend die erweiterte Michaelis-Menten-Gleichung

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M (1 + [I]/K_i) + [S]}, \quad (18)$$

in der K_M um den Klammerausdruck ergänzt ist.

Da sich alle zur Auswertung benötigten Gleichungen von (18) ableiten lassen, erscheint auch dort das Produkt aus K_M und Klammer. Im folgenden werden bei den verschiedenen Diagrammtypen die auftretenden Veränderungen der Geraden durch Inhibition erläutert, ohne alle erhaltenen Parameter anzugeben. Ferner wird die Ermittlung der Inhibitionskonstante beschrieben [Bisswanger, 1979].

2.4.3.1 Lineweaver-Burk-Diagramm

Die Geraden verlaufen bei höherer InhibitorKonzentration steiler und schneiden sich auf der v -Achse bei $1/V_{\max}$ (Abb. 2.13). Durch Auftragen der ermittelten Steigungen der Geraden über der InhibitorKonzentration $[I]$ ergibt sich im *Sekundärdiagramm* eine weitere Gerade, die die $[I]$ -Achse bei $-K_i$ schneidet.

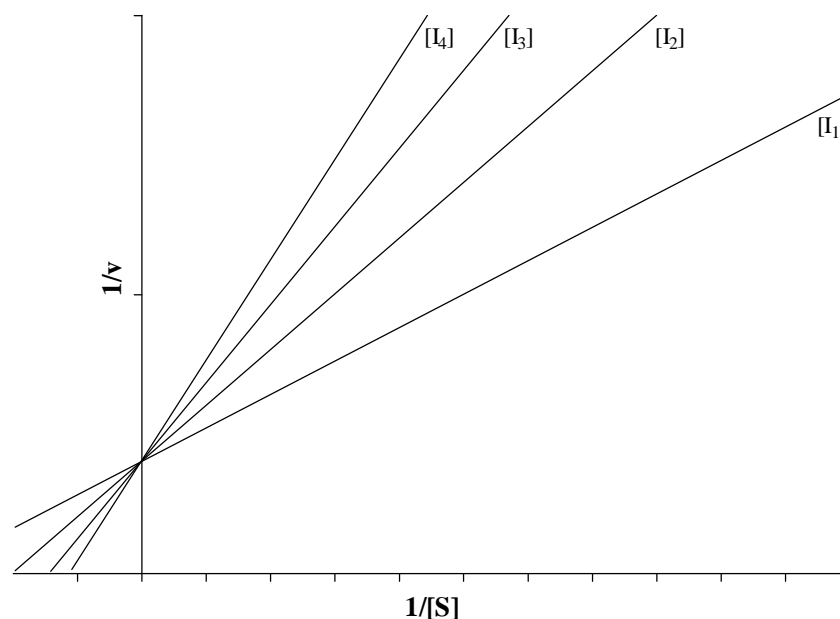


Abb.2.13: Kompetitive Inhibition, Auftragung nach Lineweaver-Burk

2.4.3.2 Hanes-Diagramm

Die erhaltenen Geraden verlaufen parallel zueinander; mit höherer InhibitorKonzentration schneiden sie die $[S]/v$ -Achse bei größeren Werten (Abb. 2.14). Im Sekundärdiagramm wird durch Auftragen dieses Achsenabschnitts über $[I]$ eine weitere Gerade erhalten, die die $[I]$ -Achse bei $-K_i$ schneidet.

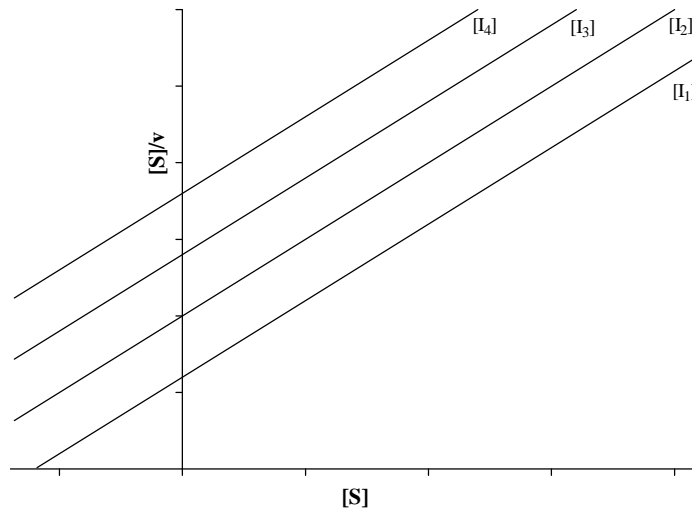


Abb. 2.14: Kompetitive Inhibition, Auftragung nach Hanes

2.4.3.3 Eadie-Hofstee-Diagramm

Die Geraden verlaufen bei höherer InhibitorKonzentration steiler und schneiden sich auf der v -Achse bei V_{\max} (Abb. 2.15).

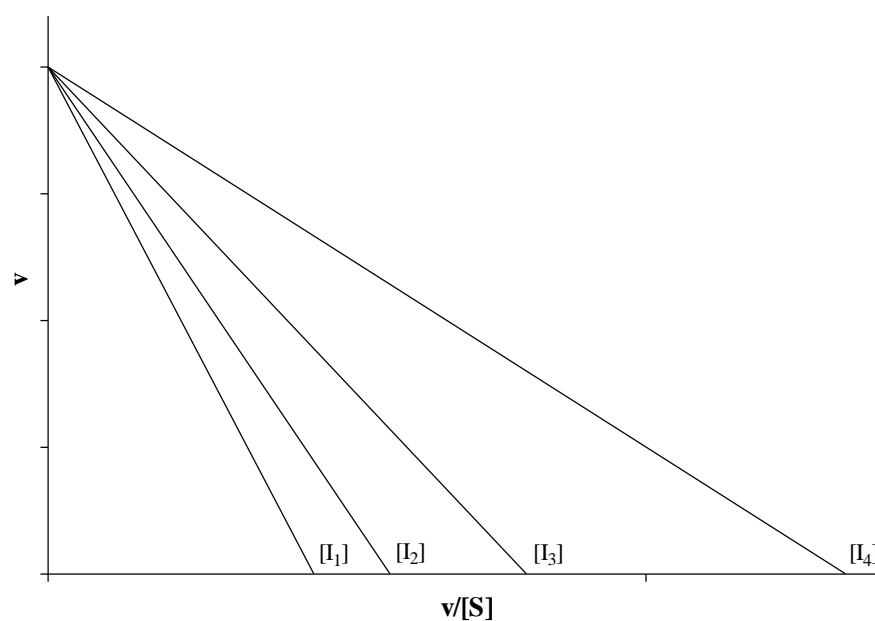


Abb. 2.15: Kompetitive Inhibition, Auftragung nach Eadie-Hofstee

Durch Auftragen der ermittelten Steigungen der Geraden über der Inhibitorkonzentration $[I]$ ergibt sich im Sekundärdiagramm eine weitere Gerade, die die $[I]$ -Achse bei $-K_i$ schneidet.

2.4.3.4 Dixon-Diagramm

Diese Diagrammform ist speziell für Inhibitionskinetiken verwendbar [Dixon, 1953]. Im Experiment wird die Substratkonzentration konstant gehalten und die Inhibitorkonzentration variiert. Durch Auftragen von $1/v$ über $[I]$ ergeben sich Geraden, die mit höherer Inhibitorkonzentration flacher verlaufen und sich schneiden. Die $[I]$ -Koordinate des Schnittpunktes entspricht $-K_i$ (Abb. 2.16).

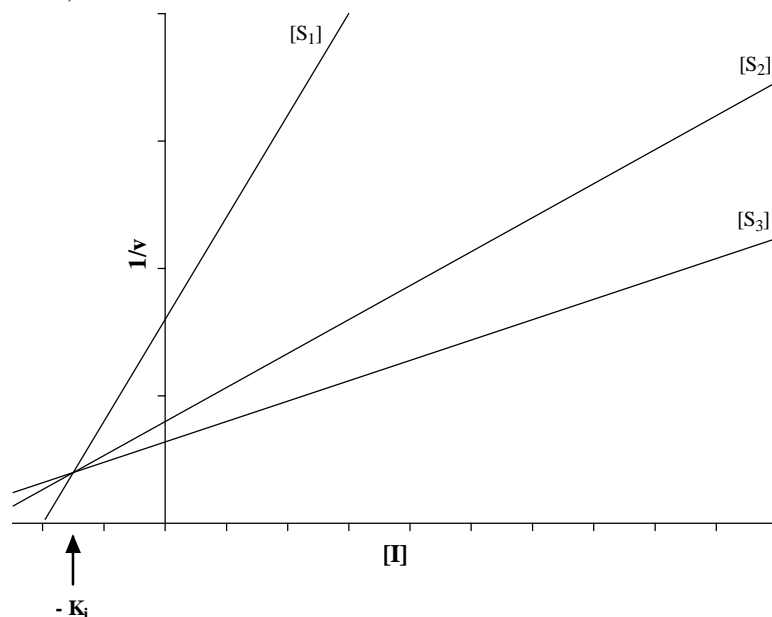


Abb. 2.16: Kompetitive Inhibition, Auftragung nach Dixon

3 Synthese der Aminosäure-Derivate

Das Phosphat-Phosphonat wurde zuerst als ein „Nebenprodukt“ der Umsetzung des C- und N-terminal geschützten Asparaginsäurechlorids mit Natriumhydrid/Diethylphosphit erhalten [Wiemann, 1995]. Eigentliches Ziel der Synthese war die Darstellung des Ketophosphonat-Derivats des Serins (analog zu [Wrobel und Dietrich, 1993]), das durch Fluorierung in das Difluoromethylphosphonat (s. Kap. 2.3) umgewandelt werden sollte. Der Mechanismus, der zu der beobachteten Umlagerung führt, ist vermutlich gemäß Abbildung 3.1 zu formulieren:

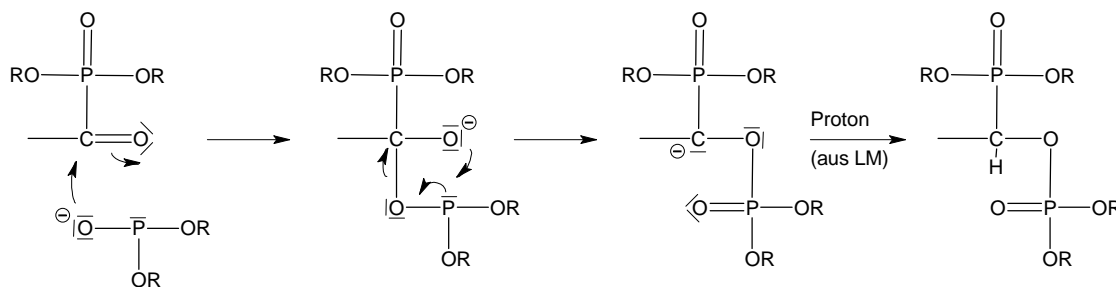


Abb. 3.1: Umlagerung zum Phosphat-Phosphonat

Diese Nebenreaktion ist seit den sechziger Jahren bekannt, jedoch nicht in der Aminosäure- oder Peptidchemie, sondern in der Chemie organischer Phosphor- und Phosphonsäureester [Pudovik et al., 1967]. Daß diese Reaktion beim Tyrosin-Analogon auf der Stufe des Ketophosphonats stehen bleibt, ist wahrscheinlich auf die Desaktivierung der Carbonylgruppe durch den aromatischen Ring zurückzuführen.

Die Verwendung schwächerer Basen als NaH führte nicht zur Bildung des Serin-Ketophosphonats. Alternativ zum Difluoromethylphosphonat wurde das Hydroxyphosphonat als Ziel ausgewählt, das - eingebaut in Peptide - ähnliche Eigenschaften in Bezug auf Wechselwirkungen mit Enzymen und Rezeptoren aufweisen sollte (s. Kap. 2.3). Als ein Vorläufer dieses Derivates kann das Phosphat-Phosphonat angesehen werden, das durch Abspaltung des Phosphatrestes durch Phosphatasen in das Hydroxyderivat übergehen sollte. Die zu diesem Derivat führende Synthese wurde entwickelt.

Weitere Synthesestrategien, die die Synthese des Difluoromethylphosphonats über das Ketophosphonat zum Ziel hatten, blieben ohne Erfolg [Gast, in Vorbereitung]. Die Synthese des Serin-Difluoromethylphosphonats gelang über einen anderen Weg, bei dem die Difluoromethylphosphonatstruktur als vorsynthetisierte Gruppe durch nukleophile Substitution in ein Serin-triflat eingebaut wird [Berkowitz et al., 1994; Otaka et al., 1995].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese der Phosphat-Phosphonat-Aminosäure wiederholt und das Derivat nach Einbau dieses Bausteins in Peptide auf seine Eignung als Phosphatase-Inhibitor untersucht.

Eine andere Methode zur Synthese eines hydroxyphosphonat-haltigen Peptids ist die direkte Synthese des Hydroxyphosphonatbausteins, dessen Synthese entwickelt und durchgeführt wurde. Nach Einbau der Aminosäure in Peptide wurde dieses Derivat ebenfalls auf seine Eignung als Phosphatase-Inhibitor getestet.

Für den Aufbau eines Peptids wurden die Phosphorsäure- und Phosphonsäuregruppen in der Seitenkette der Aminosäurebausteine geschützt. In den letzten Jahren ist in einigen Fällen von diesem Prinzip des maximalen Schutzes mit Erfolg abgewichen worden [Garcia-Echeverria, 1995; Ottinger et al., 1993]. Der Vorteil einer Synthese mit ungeschützten Bausteinen liegt zum einen darin, daß das fertig synthetisierte Peptid direkt eingesetzt werden kann. Eine Entschützungsprozedur entfällt, in deren Verlauf durch die meist drastischen Bedingungen oft Nebenreaktionen auftreten, die durch die Reagenzien selber oder durch die Reaktionsprodukte verursacht werden können. Zum anderen ist der Raumbedarf der Aminosäuren geringer, so daß die sterische Hinderung bei der Kopplung des Derivates bzw. der nächsten Aminosäure geringer ist. Daraus resultiert eine höhere Kopplungsgeschwindigkeit bzw. -ausbeute.

Diesen Vorteilen steht allerdings entgegen, daß es in den Seitenketten während der Synthese zu Nebenreaktionen kann: Die freien Phosphorsäure- und Phosphonsäuregruppen können durch aktivierte Aminosäuren acyliert werden. Auch ist es möglich, daß sich die Einführung der sauer reagierenden Seitenketten auf die basenkatalysierten Kopplungen (s. Kap. 2.2.4) oder die Analytik des Kopplungsverlaufs negativ auswirkt.

3.1 Phosphat-Phosphonat-Derivate

3.1.1 Syntheseplanung

Die Synthese des Phosphat-Phosphonat-Bausteins verlief nach der bereits verwendeten Strategie (Abb. 3.2, [Wiemann, 1995]), die Reaktionsschritte wurden weiter optimiert.

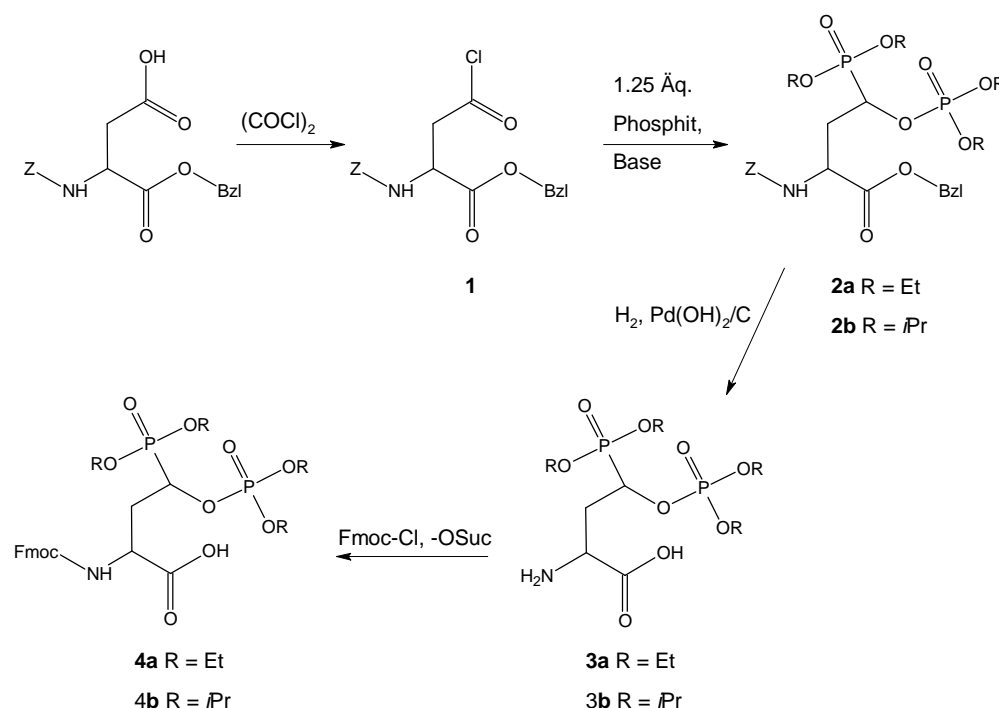


Abb. 3.2: Synthesestrategie für den Phosphat-Phosphonat-Baustein

Ausgegangen wurde von der L-Asparaginsäure, die C-terminal als Benzylester und N-terminal als Benzylcarbamat geschützt ist; das Derivat Z-Asp-OBzl ist kommerziell erhältlich. Zunächst wurde die Carboxylgruppe in der Seitenkette in das Säurechlorid **1** überführt, das durch Umsetzung mit einem Natriumdialkylphosphit über die oben erwähnte Umlagerung das Phosphat-Phosphonat **2a** bzw. **2b** ergab. Abschließend wurden die C- und N-terminalen Schutzgruppen abgespalten (Derivat **3a** bzw. **3b**) und die für die Peptidsynthese erforderliche Fmoc-Gruppe eingeführt (Derivat **4a** bzw. **4b**).

Bei der Reaktion zu **2** wurden durch Einführung eines neuen chiralen Zentrums an C-4 Diastereomere gebildet. Das Verhältnis der Isomere liegt laut ^{31}P -NMR-Spektren der Rohprodukte zwischen 1:3 und 1:5, wobei die relativen oder absoluten Konfigurationen nicht ermittelt wurden. Das Auftreten der Diastereomere war auch durch Linienverdopplungen in ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren zu erkennen und wurde in allen nachfolgenden Produkten ebenfalls beobachtet. Eine Trennung der Isomere konnte allerdings nur bei der Verbindung **4a** erreicht werden.

3.1.2 Darstellung von N-(Benzyloxycarbonyl)-L-asparaginsäure-4-chlorid-1-benzylester (Z-Asp(Cl)-OBzl, **1**)

Die Säuregruppe in der Seitenkette konnte bei Verwendung von Oxalylchlorid in Dichlormethan

quantitativ zum Säurechlorid **1** umgesetzt werden. Während die Reaktion mit dem Reagenz alleine nur bei erhöhten Temperaturen mit ausreichender Geschwindigkeit verläuft, gelingt die Umsetzung unter Zusatz katalytischer Mengen DMF schon bei Raumtemperatur innerhalb von einer Stunde. Als weiteres Produkt entsteht das Monochlorid der Oxalsäure, welches jedoch nicht stabil ist und in Kohlenmonoxid, Kohlendioxid und Chlorwasserstoff zerfällt. Daher muß das Oxalylchlorid in äquimolaren Mengen eingesetzt werden. Es war festzustellen, daß das Reaktionsprodukt in höherer Reinheit erhalten wurde, wenn die Reaktionslösung ohne Erwärmen im Vakuum eingeeengt wurde.

Das als Standardreagenz zur Säurechloriddarstellung gebräuchliche Thionylchlorid wurde hier aufgrund der zuvor festgestellten geringeren Reinheit des Produkts und der längeren Reaktionszeit [Wiemann, 1995] nicht verwendet.

3.1.3 Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphato-4-dialkylphosphono-buttersäure-benzylester (Z-Appb(R₄)-OBzl, **2a und **2b**)**

Die Umsetzung des Asparaginsäurechlorids **1** mit Natriumdiethylphosphit in THF führte bei Einsatz im stöchiometrischen Verhältnis 2:1 des Phosphits zur Aminosäure zu Nebenreaktionen, die Ausbeute an Phosphat-Phosphonat **2a** lag unter 10 %. Durch Zugabe des Phosphits in kleinen Portionen und Verfolgung der Produktbildung mit HPLC-Messungen konnte das optimale Verhältnis der Reaktanden zu 1,25 Äquivalenten Phosphit auf 1 Äquivalent Aminosäure ermittelt werden [Wiemann, 1995].

Die Ausbeuten lagen etwas höher, als in der Literatur für derartige Umlagerungen angegeben ist (16 % - 20 %, [Pudovik et al., 1967]): Die Aminosäure wurde in 13 % Ausbeute zum Produkt umgesetzt (das entspricht 21 % des maximal möglichen Wertes). Weitere 29 % der Aminosäure konnten in Form des hydrolysierten Edukts Z-Asp-OBzl wiedergewonnen werden.

Die Umsetzung mit Natriumdiisopropylphosphit verlief ebenfalls zum Phosphat-Phosphonat **2b**, das Ketophosphonat konnte nicht nachgewiesen werden. Die optimale Stöchiometrie Phosphit zu Aminosäure lag bei 5:1 und somit deutlich höher als beim Ethylderivat. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, daß sich durch die sperrigen Isopropylgruppen zunächst das kinetisch kontrollierte Produkt bilden kann. Daher ist eine höhere Menge an Reagenz für eine

hohe Umsetzung notwendig. Bei längerer Reaktionszeit geht das Produkt in thermodynamisch günstigere Produkte über, die beim Ethylderivat vermutlich direkt entstehen können.

Entscheidend bei der Reaktion war, daß die Aufarbeitung des Gemischs nach kurzer Zeit erfolgte. Wurde über mehrere Stunden gerührt, so reagierte das Produkt weiter und bildete durch Umesterung den 1-Isopropylester (vermutlich ein thermodynamisch begünstigtes Produkt). Die Ausbeute an dem gewünschten Produkt betrug 28 %, es wurden 37 % Edukt wiedergewonnen.

Versuche zur Darstellung der *tert*-Butyl- und Benzylderivate schlugen fehl, die Umsetzungen ließen weder die Bildung der entsprechenden Produkte noch die Umsetzung zum Ketophosphonat erkennen. Dies ist vermutlich auf die sterische Hinderung durch die großen Gruppen zurückzuführen.

3.1.4 Darstellung von (2L)-2-Amino-4-dialkylphosphato-4-dialkylphosphono-buttersäure (Appb(R₄), 3a und 3b)

Die C- und N-terminalen Schutzgruppen wurden in einem Schritt durch katalytische Hydrierung mit Palladiumhydroxid auf Kohle abgespalten. Der Katalysator wurde dabei zunächst zum Metall reduziert und damit aktiviert. Da sich saure Bedingungen für Hydrierungen allgemein als günstig erwiesen haben [Rylander, 1967], wurde die Reaktion in Eisessig durchgeführt. Die Reaktion war bei beiden Derivaten nach 1 Stunde bis 1,5 Stunden vollständig, was durch Verschwinden des Eduktsignals in der HPLC nachgewiesen wurde. Das Lösungsmittel wurde nach Filtration durch Lyophilisierung entfernt. Laut NMR-Spektren waren in den ölig angefallenen Produkten immer noch Spuren von Essigsäure vorhanden, weswegen aus Dioxan erneut lyophilisiert wurde. Dadurch konnten die Substanzen **3a** und **3b** in der Regel als Feststoffe erhalten werden, die Ausbeuten lagen jeweils bei 94 %.

3.1.5 Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphato-4-dialkylphosphono-buttersäure (Fmoc-Appb(R₄)-OH, 4a und 4b)

Zur Einführung der Fmoc-Gruppe werden viele Varianten verwendet, deren Unterschiede hauptsächlich in der Auswahl der zur Reaktion notwendigen Basen und Lösungsmittel liegen [Fields und Noble, 1990].

Die von L. Carpino bei der Entwicklung der Fmoc-Schutzgruppe verwendete Methode, die Gruppe durch das 9-Fluorenylmethyl-chloroformiat (Fmoc-Cl) in einem Lösungsmittelgemisch aus Dioxan und Natriumcarbonat oder -hydrogencarbonat einzuführen [Carpino und Han, 1970], weist einen Nachteil auf: Es kann über ein gemischtes Anhydrid als Zwischenstufe zur Bildung eines Dipeptids kommen (Abb. 3.3).

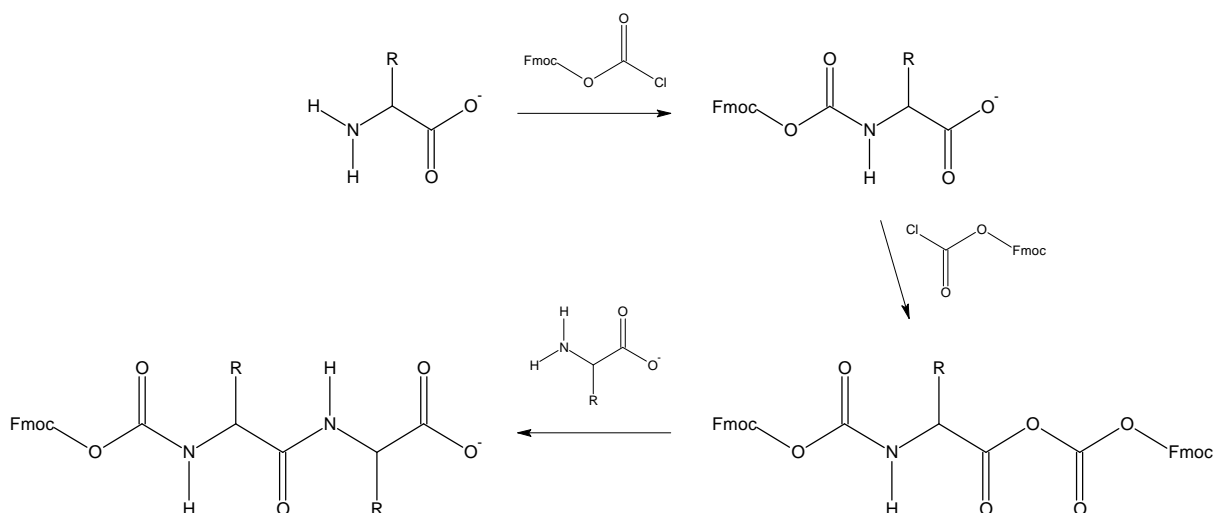


Abb. 3.3: Bildung des Dipeptids bei Fmoc-Einführung

Es ist jedoch möglich, diese Folgereaktion zu unterbinden. Wird anstelle des Fluorenylmethyl-Esters ein gemischtes Fluorenylmethyl-carbonat wie z. B. Fmoc-OSuccinimid (Fmoc-OSuc) eingesetzt, so ist eine Umsetzung über das geschützte Derivat hinaus nicht möglich. Eine andere Methode zur Verhinderung der Dipeptidbildung ist die Überführung der Aminosäure in das C- und N-terminale TMS-Derivat, das unter Basenzusatz mit Fmoc-Cl ausschließlich das geschützte Monomer ergibt [Bolin et al., 1989]. Auch die Umwandlung der Aminosäure in das Lithiumsalz durch Zusatz von Li_2CO_3 kann das Ausmaß an Dimerisierung deutlich absenken.

Für die Reaktion mit Fmoc-OSuc sind als Lösungsmittel (-gemische) Dichlormethan, Ethylacetat, Wasser/Dioxan, Wasser/Acetonitril, Wasser/Aceton, Wasser/DMF und Acetonitril/Methanol sowie als Basen Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Triethylamin oder Diisopropylethylamin (DIEA) gebräuchlich.

Die Verwendung der „klassischen“ Methode der Einführung mit Fmoc-OSuc in einem Gemisch aus Dioxan und ges. NaHCO_3 -Lösung führte bei der ethylgeschützten Aminosäure zu einer Ausbeute von 36 %. Nach Zugabe von insgesamt 7 Äquivalenten des Fmoc-OSuc wurde das als

Natriumsalz vorliegende Produkt durch Ansäuern der Reaktionsmischung ausgefällt und extrahiert. Das Rohprodukt enthielt neben nicht umgesetztem Fmoc-Derivat noch andere Reaktionsprodukte. Durch Trennung mit Säulenchromatographie ließen sich in zwei Fraktionen ein Gemisch aus Produkt (2 Diastereomere) und Fmoc-Edukt bzw. das reine Produkt (1 Diastereomer) gewinnen. Aus dem Gemisch konnte weiteres Produkt durch HPLC-Trennung als separierte Diastereomere isoliert werden. Dabei wurde eine Ungleichverteilung festgestellt, das eine Isomer wurde im fünffachen Überschuß erhalten.

^{31}P -NMR-Spektren beider Substanzen zeigten Signale des jeweils anderen Isomers, eine Bestimmung der relativen oder absoluten Konfiguration wurde nicht durchgeführt:

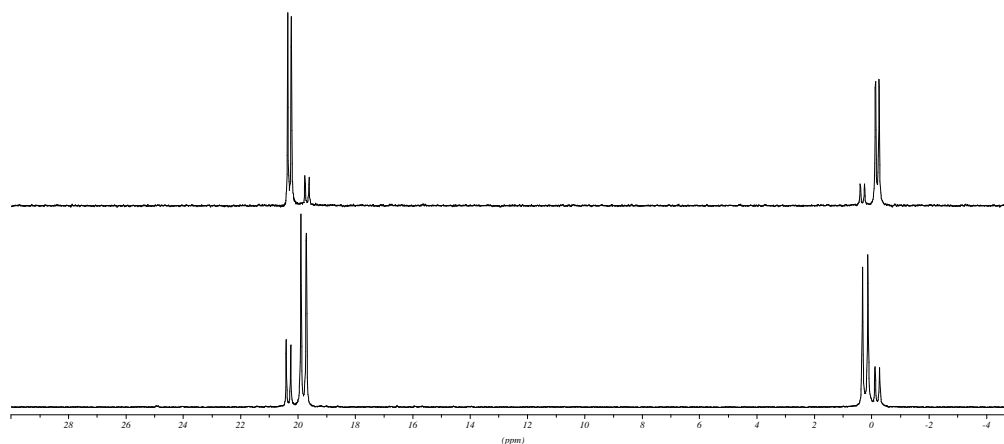


Abb. 3.4: ^{31}P -NMR-Spektren der beiden Diastereomere, gelöst in CDCl_3 , das obere Spektrum zeigt das im Überschuß gebildete Isomer, Signale bei ca. 20 ppm: Phosphonatgruppen, Signale bei ca. 0 ppm: Phosphatgruppen

Da sich die ethylgeschützte Aminosäure **4a** nach Einbau in ein Peptid (s. Kap. 4.1.4) als nicht zu entschützen herausstellte (s. Kap. 4.3.2), wurde auf eine Optimierung der Fmoc-Einführung in diese Aminosäure verzichtet.

Die bei der Ethylgruppe verwendete Methode ($\text{Fmoc-OSuc}/\text{NaHCO}_3/\text{Dioxan}$) ergab für das Isopropylderivat **4b** eine Ausbeute von nur 22 %. Die Umsetzung in Dichlormethan mit Fmoc-OSuc und DIEA verlief mit 25 % nur geringfügig besser, der Wechsel zu $\text{Fmoc-Cl}/\text{DIEA}/\text{Ethylacetat}$ erwies sich sogar als kontraproduktiv (16 %). Ein deutlicher Anstieg der Ausbeute auf 59 % konnte durch Verwendung von $\text{Fmoc-Cl}/\text{DIEA}/\text{Dichlormethan}$ erzielt werden. Ähnlich gute Ausbeuten ergaben sich mit $\text{Fmoc-OSuc}/\text{DIEA}/\text{Acetonitril}/\text{MeOH}$ und $\text{Fmoc-Cl}/\text{TMS-Cl}/\text{DIEA}/\text{Dichlormethan}$ (60 % bzw. 67 %). Zu letzterer Methode ist anzumerken, daß nach dem Extraktionsvorgang keine Reinigung des Produkts notwendig war. Allerdings stellte sich diese Methode wegen der fehlenden Reaktionskontrolle der Umsetzung mit TMS-Cl als nicht

verlässlich reproduzierbar heraus, so daß die bevorzugte Variante die Reaktion mit Fmoc-OSuc und DIEA in Acetonitril/MeOH darstellt.

3.2 Hydroxyphosphonat-Derivate

3.2.1 Syntheseplanung

Um ein Peptid mit einer Hydroxyphosphonat-Struktur in einer Seitenkette direkt zu erhalten, wurde folgende Synthesestrategie entwickelt (Abb. 3.5):

Ausgehend von dem gleichen Derivat wie beim Phosphat-Phosphonat, Z-Asp-OBzl, wurde zunächst die Seitenkette in den Aldehyd überführt. Die Reaktionen verliefen dabei zunächst analog zu publizierten Synthesen des Methylphosphonats des Serins [Perich, 1994; Valerio et al., 1988]. Die Asparaginsäure wurde durch Reduzierung in das Homoserin **5** (Hse) überführt und dieses dann zum Asparaginaldehyd **6** (Asa) oxidiert. Die Umsetzung mit einem Dialkylphosphit ergab das Hydroxyphosphonat **7a** bzw. **7b**. Bei dieser Reaktion kam es durch Einführung eines neuen Chiralitätszentrums am C-4 zur Bildung von Diastereomeren. Es wurde festgestellt, daß die Isomere laut ^{31}P -NMR-Spektren der Rohprodukte in einem Verhältnis von ca. 1:2 gebildet wurden, was wahrscheinlich auf den Einfluß der Konfiguration an C-2 zurückzuführen ist. Eine Bestimmung der relativen oder absoluten Konfigurationen wurde nicht durchgeführt. Das Auftreten von Diastereomeren zeigte sich auch durch Linienvervielfältigung in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren.

Als Alkylschutzgruppe für die Phosphonsäurefunktion wurde nach den Erfahrungen bei der Synthese des Phosphat-Phosphonats zunächst die Isopropylgruppe gewählt, da sie leichter als die Ethylgruppe abzuspalten sein sollte. Da es jedoch bei der Verwendung der Isopropylgruppe nicht gelang, ein Peptid mit der Hydroxyphosphonat-Aminosäure zu entschützen (s. Kap. 4.3.3), wurde als Alternative die säurenlabilere *tert*-Butylgruppe verwendet.

Abweichend von der publizierten Syntheseroute wurde das Hydroxyphosphonat nicht in das Methylphosphonat überführt. Statt dessen blieb die Hydroxylgruppe zunächst ungeschützt, es wurden die C- und N-terminalen Schutzgruppen abgespalten (Derivate **8a** bzw. **8b**) und die

Fmoc-Gruppe am N-Terminus eingeführt.

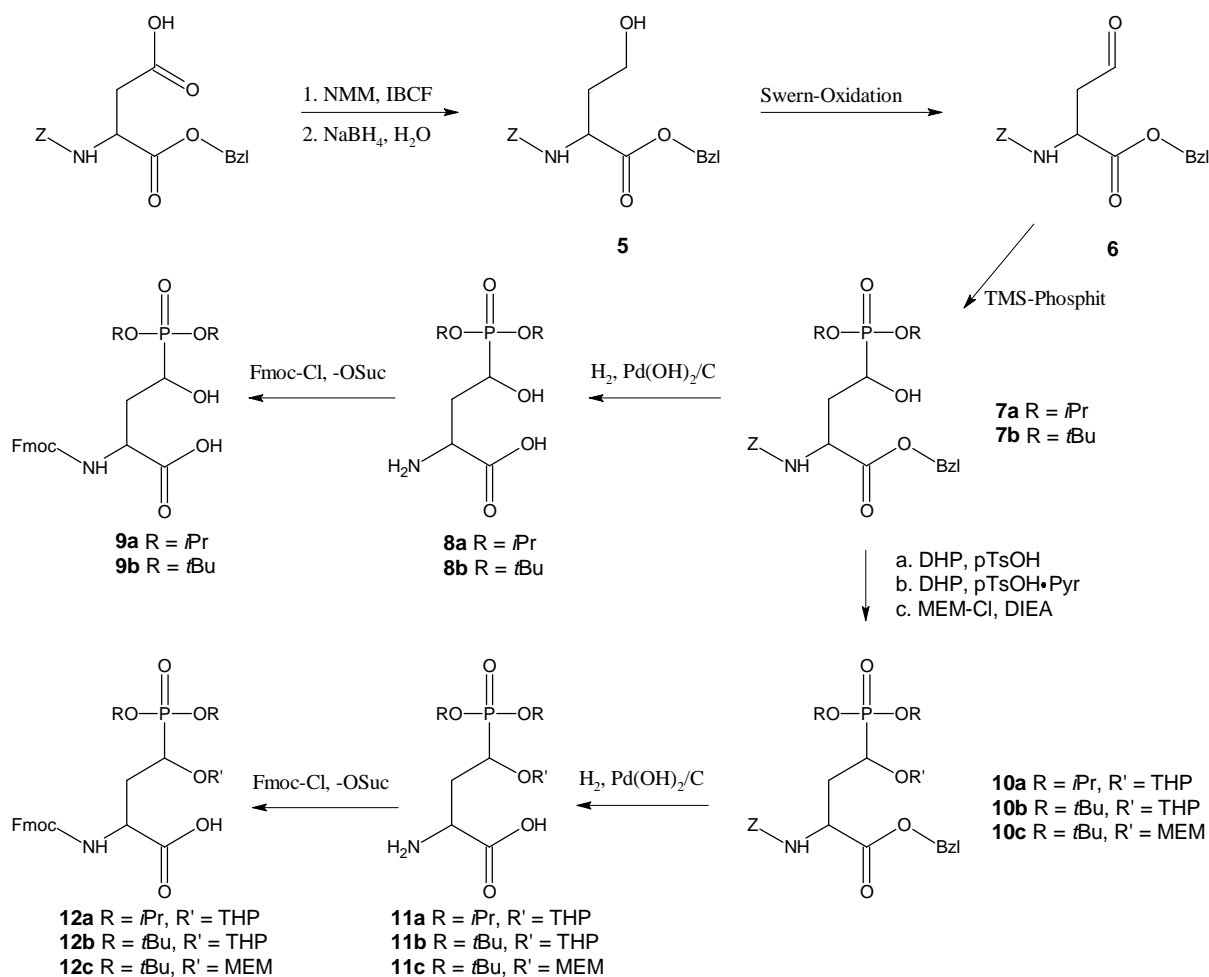


Abb. 3.5: Synthesestrategie für den Hydroxyphosphonat-Baustein

Da diese Derivate **9a** und **9b** bei der Aktivierung für die Kopplung an ein Peptid, zum Teil jedoch schon bei der Fmoc-Einführung zum Lacton zyklisierten (s. Kap. 3.2.6), war die Einführung einer Hydroxylschutzgruppe notwendig (Derivate **10a**, **10b**, **10c**). Anschließend erfolgte der Schutzgruppenaustausch über die Derivate **11a**, **11b** bzw. **11c** zu den Fmoc-Aminosäuren **12a**, **12b**, **12c**. Bei allen Derivaten wurden in den NMR-Spektren das Auftreten der Diastereomeren beobachtet, es gelang aber nur bei **12c**, diese zu trennen.

Aus der Vielzahl der Hydroxylschutzgruppen wurden die Tetrahydropyranyl-(THP-) und die Methoxyethoxymethyl-(MEM-)gruppe ausgewählt.

Die THP-Gruppe sollte durch Behandlung mit TFA bei der Abspaltung des Peptids vom Träger zusammen mit den *tert*-Butylgruppen gespalten werden und so einen zusätzlichen Schritt zur Entschützung überflüssig machen. Sie besitzt allerdings zwei Nachteile: Einer ist, daß sie gegenüber Säuren sehr instabil ist und unter Umständen bereits durch Essigsäure (bevorzugtes

Lösungsmittel bei Hydrierungen) oder verdünnte TFA (0,1 % in HPLC-Laufmittel) gespalten wird. Es ist dementsprechend auf die Verwendung von Säuren in der weiteren Synthese zu verzichten. Das zweite Problem ist, daß durch die THP-Gruppe ein weiteres chirales C-Atom in das Molekül eingeführt wird, wobei Diastereomere entstehen. Da synthesebedingt durch das chirale C-4 der Aminosäure bereits Diastereomere vorliegen, existieren jetzt vier Isomere, was sich in einer weiteren Signalvervielfältigung und Komplizierung in NMR-Spektren bemerkbar macht. Zusätzlich verbreitern sich die Peaks in der HPLC und verschlechtern damit möglicherweise die Trennung. Als Vorteile sind die leichte Einführung sowie das preiswerte Edukt zu nennen.

Die MEM-Gruppe ist laut Literatur [Kocienski, 1994] unter den Bedingungen der Peptidabspaltung stabil und wird anschließend mit Lewis-Säuren wie Zinkbromid gespalten. Sie ist einfacher zu handhaben, übersteht die erwähnten Schritte mit Säureeinfluß, und es wird kein weiteres Chiralitätszentrum eingeführt. Allerdings ist ein weiterer Schritt zu ihrer Abspaltung notwendig.

3.2.2 Darstellung des N-(Benzyloxycarbonyl)-L-homoserin-1-benzylesters (Z-Hse-OBzl, 5)

Zur Reduktion der Carbonsäure zum Alkohol **5** wird die Säure zunächst in ein gemischtes Anhydrid überführt. Als Reagenz dafür sind Chlorameisensäureester wie Isobutylchloroformiat gebräuchlich, die ein Kohlensäureanhydrid bilden. Dieses ist im Vergleich zum Ester an C-1 so reaktiv, daß es von dem komplexen Hydrid Natriumborhydrid NaBH_4 selektiv reduziert werden kann [Kokotos, 1990; Rodriguez et al., 1991]. Die Verwendung von Lithium-aluminiumhydrid würde durch eine zweite Reduktion auch den C-terminalen Ester in einen Alkohol überführen.

Zur Umsetzung der Säure in das Anhydrid wurde das Chloroformiat bei Temperaturen unter $-30\text{ }^\circ\text{C}$ zu einer Lösung der Säure in Dimethoxyethan gegeben. Eine zugesetzte Base (N-Methylmorpholin) fing den gebildeten Chlorwasserstoff unter Salzbildung ab, das Salz wurde abfiltriert. Laut Literatur kann auf eine Filtration verzichtet werden, falls im nächsten Schritt ein deutlicher Überschuß an Hydrid (3 Äquivalente) eingesetzt wird [Rodriguez et al., 1991]. Eine nach dieser Methode durchgeführte Umsetzung ergab jedoch ein unsauberes Produkt in geringer Ausbeute. Weiterhin war es wichtig, daß die Reaktion bei tiefer Temperatur durchgeführt wurde, da sich sonst das Anhydrid wieder zersetzte und die nachfolgende Reduktion mit

schlechten Ausbeuten verlief.

Das Filtrat wurde auf $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und mit 1,5 Äquivalenten NaBH_4 in Wasser versetzt, wobei starke Gasentwicklung einsetzte. Nach 30 bis 60 Sekunden war diese beendet, und die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgestoppt und aufgearbeitet. Längere Reaktionszeiten führten zu einem unsauberen Produkt und wurden aufgrund dessen vermieden.

Bei Beachtung der genannten Bedingungen konnten hohe Ausbeuten von über 90 % erzielt werden.

3.2.3 Darstellung von N-(Benzyloxycarbonyl)-L-asparaginaldehyd-1-benzylester (Z-Asa-OBzl, 6)

Unter der Vielzahl an Methoden zur Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden und Ketonen sind auch milde Verfahren wie die Swern-Oxidation (Abb. 3.6) oder die Umsetzung mit 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) zu finden.

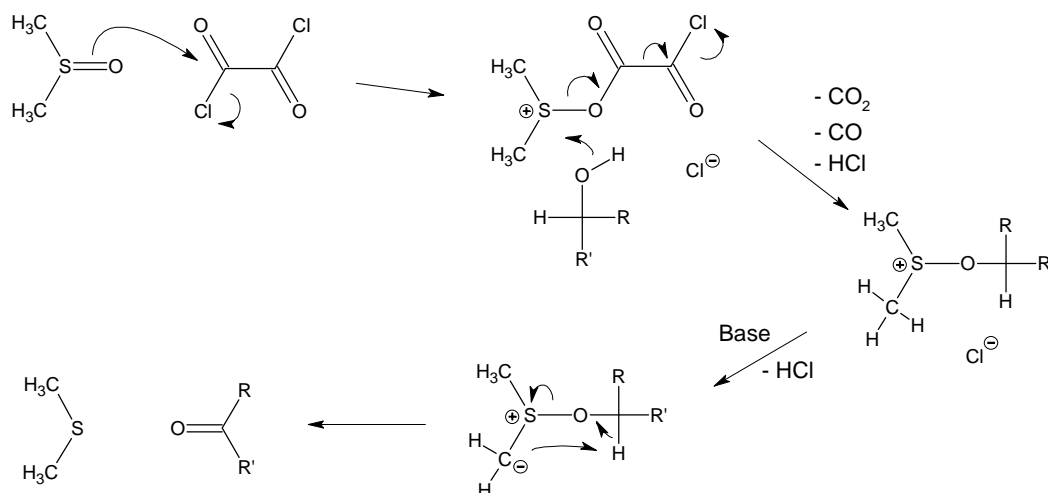


Abb. 3.6: Mechanismus der Swern-Oxidation

Insbesondere die Swern-Oxidation ist für empfindliche Substanzen geeignet. Bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird zunächst aus Dimethylsulfoxid und Oxalylchlorid eine aktivierte Verbindung gebildet, die vom Alkohol nukleophil angegriffen wird und unter Freisetzung von CO , CO_2 und HCl reagiert. Durch Zugabe einer Base (Triethylamin) wird aus einer Methylgruppe des DMSO ein Proton abstrahiert, und nach einer Umlagerung, bei der Dimethylsulfid gebildet wird, entsteht der Aldehyd/das Keton.

Die Oxidation zum Asparaginaldehyd **6** wurde analog zu einer publizierten Vorschrift [Walker et al., 1990] durchgeführt. Wie aus den NMR-Spektren ersichtlich, lagen im Rohprodukt nur geringe Mengen an Edukt oder anderen Verunreinigungen vor (max. 20 %), so daß es direkt eingesetzt werden konnte. Eine Trennung mit Säulenchromatographie war mit Verlusten an Produkt verbunden, die Ausbeute lag bei 65 %. In der Literatur ist diese Umsetzung als quantitativ beschrieben [Walker et al., 1990], was so jedoch nicht nachvollzogen werden konnte. Die nachfolgende Umsetzung verlief mit dem gereinigtem Aldehyd sauberer, die Gesamtausbeute über beide Stufen lag höher.

3.2.4 Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphono-4-hydroxy-buttersäure-benzylester (Z-Ahpb(R₂)-OBzl, 7a und 7b)

Bei der Umsetzung des Aldehyds mit Dialkylphosphit können zwei Diastereomere gebildet werden. Das Verhältnis der beiden Isomere ist dabei abhängig von der verwendeten Base [Patel et al., 1990], der höchste Diastereomerenüberschuß wurde durch Einsatz von Kaliumfluorid in DMF erzielt. Bei Vorversuchen zeigte sich jedoch, daß weder der Zusatz von CsF noch der Zusatz der Basen DBU, DIEA, NMM oder TEA in den angegebenen Lösungsmitteln zu einer Reaktion führte. Daher wurde eine nicht stereoselektive Reaktion mit 2 Äquivalenten Trimethylsilyl-dialkylphosphit durchgeführt [Perich, 1994; Tong et al., 1992]. Die Synthese des eingesetzten Trimethylsilyl-diisopropylphosphits erwies sich als schwierig, bei Destillation wurde ein Gemisch aus Produkt und nicht umgesetztem Edukt erhalten. Auch verlief die Umsetzung dieses Gemischs mit dem Aldehyd nur mit relativ schlechten Ausbeuten. Eine bessere Umsetzung wurde erreicht, wenn die aus den Natriumdialkylphosphiten und TMS-Chlorid gebildeten TMS-Phosphite nicht isoliert, sondern direkt unter Abtrennung des NaCl zum Aldehyd getropft wurde. Dabei war zu beachten, daß die Reaktion bei Verwendung des Isopropylderivates erst nach Rühren über mehrere Stunden oder über Nacht abgeschlossen war. Beim *tert*-Butylderivat war die Umsetzung schon nach 1 bis 2 Stunden beendet, längere Reaktionszeiten führten hier zur Zersetzung des Produkts. Die Aufarbeitung erfolgte im Falle des Isopropylderivates durch Zugabe von Wasser und Extraktion mit Ethylacetat, im Falle des *tert*-Butylderivates durch Pufferzugabe (pH 7) und Extraktion.

Die in der Literatur angegebene Umsetzung des trimethylsilyl-geschützten Hydroxyphosphonats zur freien Hydroxylverbindung durch Erhitzen mit Wasser [Tong et al., 1992] führte zur Zersetzung des Produkts. Als Alternative wurde das Rohprodukt über eine Kieselgelplatte oder

-säule getrennt und dabei entschützt. Diese Reaktion erwies sich bei größeren Mengen des Diisopropylderivats jedoch als unvollständig. Daher wurde das Rohprodukt in Methanol mit katalytischen Mengen Zitronensäure für 1 Stunde gerührt und zum gewünschten Produkt umgesetzt. Die Reinigung erfolgte zunächst über eine Kieselgelsäule und anschließend durch präp. HPLC. Die Ausbeuten an Isopropyl- bzw. *tert*-Butylderivat **7a** bzw. **7b** lagen bei 66 % bzw. 53 % (Literaturangabe für Boc-Derivat: 87 % [Perich, 1994]).

3.2.5 Darstellung von (2L)-2-Amino-4-dialkylphosphono-4-hydroxy-buttersäure (Ahpb(R₂), **8a** und **8b**)

Die Hydrierung zu den Derivaten **8a** bzw. **8b** verlief analog zu der in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Reaktion. Bei der *tert*-Butylverbindung **8b** wurde innerhalb der Reaktionsdauer von 2 Stunden keine Spaltung der *t*Bu-Gruppen beobachtet, sie waren unter diesen Bedingungen stabil.

3.2.6 Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphono-4-hydroxy-buttersäure (Fmoc-Ahpb(R₂)-OH, **9a** und **9b**)

Die zur Fmoc-Einführung geeigneten Methoden wurden bereits in Kapitel 3.1.5 erläutert.

Die Verwendung von Fmoc-Cl/DIEA/Dichlormethan zur Umsetzung zum isopropylgeschützten Aminosäurebaustein Fmoc-Ahpb(*i*Pr₂) führte zu zwei Produkten. Das eine Produkt konnte als die gewünschte Aminosäure **9a** identifiziert werden. Das zweite Produkt unterschied sich nur wenig von diesem: Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte als einzigen Unterschied das H-4 um ca. 0,5 ppm tieffeldverschoben (4,51 ppm statt 3,97 ppm), das ³¹P-NMR-Signal lag um 6 bis 7 ppm niedriger, und ein MALDI-Massenspektrum zeigte eine Masse von 509 Da statt 505 Da. In der HPLC wurde der Unterschied deutlicher: Die erste Substanz wurde bei 40,6 % Acetonitril als breiter Peak eluiert, die zweite Substanz als scharfer Peak bei 58,8 %. Durch Messen eines FAB-Massenspektrums wurde die zweite Molekülmasse zu 487 Da bestimmt, der Peak bei 509 Da war dem Natrium-Addukt zuzuordnen (+ 22 Da).

Aus diesen Messungen wurde eine Reaktion unter Wasserabspaltung gefolgert, als Produkt

entstand das Lacton durch Reaktion der Hydroxylgruppe am C-4 (^1H -Verschiebung von H-4) mit der freien Carboxylgruppe am C-1:

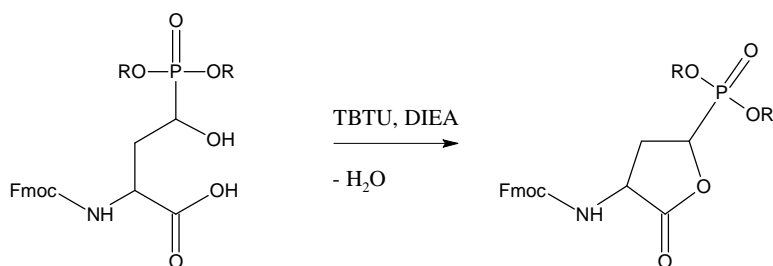


Abb. 3.7: Lactonbildung bei Aktivierung des C-Terminus zur Peptidsynthese

Dadurch wurde das zweite Produkt unpolarer, was die Lage des Peaks in der HPLC erklärt. Bei Serin- oder Threoninderivaten ist die Ausbildung des Lactons nur sehr schwer möglich, da sich ein gespannter Vierring bilden müßte. Bei dem hier vorliegenden Homoserinderivat wurde ein spannungsarmer Fünfring geschlossen. Diese Reaktion ist bekannt, wird aber aufgrund der seltenen Verwendung von Homoserin in der Regel nicht erwähnt. Die Bildung des Produktgemischs konnte auch durch andere Reaktionsbedingungen wie Fmoc-OSuc/DIEA/Dichlormethan nicht verhindert werden.

Das gewünschte, offenkettige Produkt **9a** wurde nach Reinigung mit TBTU und DIEA aktiviert, um das Verhalten während einer Kopplung zu untersuchen. Sowohl HPLC- als auch Massensanalyse zeigten eine Umsetzung zum Lacton. Folglich ist eine Peptidsynthese mit diesem Derivat nicht möglich, es wurde daher auch nicht versucht, das Lacton in die offenkettige Verbindung zu überführen.

Das entsprechende *tert*-Butylderivat **9b** konnte fast ausschließlich in der offenkettigen Form erhalten werden, eine Aktivierung führte jedoch neben anderen Reaktionen ebenfalls zur Lactonbildung.

Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, daß die Hydroxylgruppe für die Peptidsynthese geschützt werden mußte. Zur Auswahl dieser Schutzgruppe siehe Kapitel 3.2.1.

3.2.7 Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure-benzylester (Z-Ahpb(THP, R₂)-OBzl, 10a und 10b)

Die einzige gebräuchliche Methode zur Einführung der THP-Gruppe ist die säurekatalysierte Umsetzung des Alkohols mit 3,4-Dihydro-2*H*-pyran (DHP) [Kocienski, 1994]. In der vorliegenden Arbeit wurde als Katalysator wasserfreie p-Toluolsulfonsäure (p-TsOH) bei Isopropylgruppen und Pyridinium-toluolsulfonat bei *tert*-Butylgruppen erfolgreich eingesetzt. Die in der Literatur vorgeschlagene Verwendung eines sauren Kationenaustauschers führte mit dem isopropylgeschützten Derivat dagegen nicht zu einer Reaktion, ebenso wie die Verwendung von konz. Salzsäure.

Die Umsetzung des isopropylgeschützten Alkohols in Toluol mit großem Überschuß an DHP und katalytischen Mengen p-TsOH führte in guter Ausbeute (79 %) zum THP-Derivat **10a**. Dabei wurde gegen Ende der Gleichgewichtsreaktion festes Natriumcarbonat zugesetzt, um die Säure zu neutralisieren. Durch präp. HPLC-Reinigung ohne Säure im Laufmittel konnten neben dem Produkt knapp 10 % des Edukts wiedergewonnen werden. Es ist nicht auszuschließen, daß bei der Aufarbeitung oder Reinigung des Produkts durch Säurespuren die THP-Gruppe abgespalten und das Edukt zurückgebildet wurde. Allerdings ist dieser Anteil im Vergleich zu nicht umgesetzten Edukt als gering einzuschätzen.

Die *tert*-Butylgruppen sind gegenüber sauren Bedingungen sehr empfindlich, weswegen die Verwendung von freien Säuren zur Katalyse nicht möglich war. Als Ersatz wurde das Pyridiniumsalz der p-Toluolsulfonsäure eingesetzt, dessen schwache Acidität (geringer als die der Essigsäure) für eine Katalyse der Umsetzung ausreichen, ohne die *tert*-Butylgruppen anzugreifen [Miyashita et al., 1977]. Nach analoger Durchführung wurde mit neutralem Puffer aufgearbeitet und das Rohprodukt unter Zusatz von 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat in Wasser (Laufmittel A, pH 7,8) mit präp. HPLC gereinigt. Die Fraktionen wurden um den Methanolanteil eingengt und das Produkt **10b** durch Extraktion mit Dichlormethan isoliert. Die Ausbeute lag mit 67 % etwas unter der des Isopropylderivates.

3.2.8 Darstellung von (2L)-2-Amino-4-dialkylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure (Ahpb(THP, R₂), 11a und 11b)

Die Abspaltung der C- und N-terminalen Schutzgruppen erfolgte analog zu Kapitel 3.1.4. Als Lösungsmittel wurden Methanol (**11a**) bzw. Ethanol (**11b**) verwendet, um die Abspaltung der THP-Gruppe durch Essigsäure zu vermeiden.

Produkt **11a** wurde nach 2 Stunden in quantitativer Ausbeute erhalten. Bei der *tert*-Butylverbindung verlief die Reaktion jedoch deutlich langsamer (mehrere Stunden bis Tage) und führte nicht zur vollständigen Umsetzung zu **11b**. Der langsame und unvollständige Verlauf der Hydrierung ist vermutlich auf die leicht alkalischen Bedingungen durch die Anwesenheit kleiner Mengen an Ammoniumhydrogencarbonat zurückzuführen. Eine Ansäuerung wurde aufgrund der Labilität der *tert*-Butylschutzgruppen nicht durchgeführt.

3.2.9 Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-dialkylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure (Fmoc-Ahpb(THP, R₂)-OH, 12a und 12b)

Die Methoden zur Einführung der Fmoc-Gruppe wurden bereits unter Kapitel 3.1.5 erläutert.

Die isopropylgeschützte Aminosäure wurde mit Fmoc-Cl/DIEA/Dichlormethan über 2 Stunden umgesetzt und ergab nach Säulenchromatographie eine Ausbeute an Produkt **12a** von 57 %. Der Einsatz von Fmoc-OSuc führte zu einer Ausbeute von 54 %.

Bei dem *tert*-Butylderivat führte der Gebrauch von Fmoc-OSuc/DIEA in Methanol/Acetonitril auch bei Reaktion über Nacht nicht zu nachweisbarem Produkt. Da die vorangegangene Abspaltung der Schutzgruppen an C- und N-Terminus über einen langen Zeitraum vorgenommen werden mußte, ist es möglich, daß dadurch Nebenreaktionen auftraten, die die Umsetzung nun verhindern.

Wegen der erfolglosen Synthese des THP-Derivates **12b** wurde das *tert*-Butylhydroxyphosphonat als MEM-Ether geschützt.

3.2.10 Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-di-*tert*-butylphosphono-4-(methoxyethoxymethoxy)-buttersäure-benzylester (Z-Ahpb(MEM, *t*Bu₂)-OBzl, **10c**)

Da sich bei der Verwendung der THP-Gruppe zusammen mit den *tert*-Butylgruppen im Verlauf der Synthese Probleme ergaben, wurde als weiteres Derivat das MEM-geschützte Hydroxyphosphonat synthetisiert. Zunächst mußte davon ausgegangen werden, daß die Stabilität des MEM-Ethers gegenüber TFA so hoch ist [Kocienski, 1994], daß die Gruppe nicht bei der allgemeinen Entschützung abgespalten wird. Die Abspaltung sollte dann mit Lewis-Säuren wie Zinkbromid erfolgen.

Die Methoxyethoxymethylgruppe ist ein Vertreter der Klasse der Acetale. Gebildet werden die MEM-Ether, wie auch MOM- und BOM-Ether, durch einen nukleophilen Angriff des Alkohols auf den entsprechenden Chloralkylether [Corey, 1989; Kocienski, 1994]. Die Umsetzung verläuft nach einem S_N1-Mechanismus: Zunächst dissoziiert das Chloridion ab, anschließend reagiert die Hydroxylgruppe mit dem Kation. Da das Alkyletherkation durch den α -ständigen Sauerstoff stabilisiert ist, verläuft diese „Alkylierung“ des Alkohols schneller als bei anderen Reagenzien wie Methyljodid oder Benzylbromid. Zum Abfangen des gebildeten Chlorwasserstoffs wird eine sterisch gehinderte und damit wenig nukleophile Base zugesetzt, um die Konkurrenzreaktion mit dem Kation zu verhindern.

Die Synthese erfolgte aus dem MEM-Chlorid, das mit dem Alkohol und DIEA in Dichlormethan über Nacht umgesetzt wurde. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch auf ein geringes Volumen eingeeengt; bei vollständigem Einengen zersetzte sich die Substanz. Nach Reinigung durch präp. HPLC wurde das Produkt **10c** in einer Ausbeute von 59 % erhalten.

3.2.11 Darstellung der (2L)-2-Amino-4-di-*tert*-butylphosphono-4-methoxyethoxymethoxybuttersäure (Ahpb(MEM, *t*Bu₂), **11c**)

Die Abspaltung der C- und N-terminalen Schutzgruppen wurde analog zu Kapitel 3.1.4 durchgeführt, ebenfalls in Essigsäure. Die *tert*-Butylgruppen blieben über 3 Stunden stabil, und das Produkt **11c** wurde in 94 % Ausbeute erhalten.

3.2.12 Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-di-*tert*-butylphosphono-4-methoxyethoxymethoxy-buttersäure (Fmoc-Ahpb(MEM, *t*Bu₂)-OH, **12c**)

Die Methoden der Einführung der Fmoc-Gruppe sind in Kapitel 3.1.5 erläutert.

Im Gegensatz zum THP-Derivat verlief die Reaktion mit Fmoc-OSuc/DIEA in Methanol/Acetonitril über Nacht erfolgreich. Nach Aufarbeitung mit neutralem Puffer und Reinigung durch Säulenchromatographie wurde das Produkt **12c** in die beiden Diastereomere getrennt in einem Verhältnis 3:2 erhalten. Eine Trennung der Isomere auf dieser Stufe durch präparative HPLC bzw. auf den vorherigen Stufen konnte nicht erzielt werden.

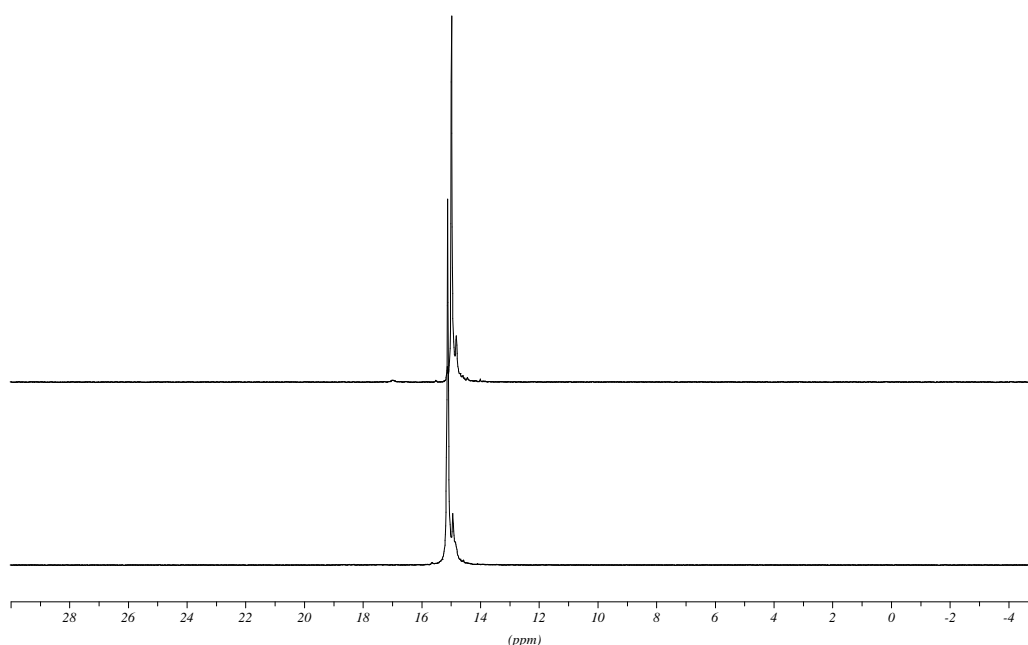


Abb. 3.8: ³¹P-NMR-Spektren der beiden Diastereomere, gelöst in CDCl₃, das obere Spektrum zeigt das im leichten Überschuß gebildete Isomer

Die Ausbeuten lagen bei 46 % bzw. 30 % (gesamt 76 %), eine Bestimmung der absoluten oder relativen Konfiguration sowie eine Syntheseoptimierung wurde nicht durchgeführt.

4 Synthese der Peptide

Als Schutzgruppentaktik für die Peptidsynthese wurde die etablierte Fmoc/*t*Bu-Methode verwendet, nicht zuletzt wegen der milden Reaktionsbedingungen. Die Peptide wurden an TentaGel-S-RAM-Harz (Fa. Rapp) aufgebaut, das die Peptide als C-terminale Amide freisetzt und damit die Carboxylgruppe blockiert. Der N-Terminus wurde zum Teil acetyliert, um ihn ebenfalls zu blockieren. Als Aktivator bei der Kopplung wurde ein Äquivalent TBTU unter Zusatz von zwei Äquivalenten N-Methylmorpholin (jeweils auf die Aminosäure bezogen) eingesetzt. Die zu koppelnde Aminosäure wurde in der Regel im vierfachen Überschuß eingesetzt. Abweichungen von diesen Verfahren sind angegeben.

Die Bestimmung der freien Aminogruppen auf dem Harz wurde mit dem Bromphenolblau-Test [Krchnak et al., 1988] durchgeführt. Dabei bindet der im Überschuß eingesetzte Farbstoff Bromphenolblau (BPB) ionisch an die Aminogruppen. Nach Auswaschen des Überschusses wird der gebundene Anteil mit einer verdünnten Base wie Diisopropylethylamin eluiert, und die Menge an BPB durch UV-Spektrometrie bestimmt. Allerdings wird mit dieser Methode immer auch unspezifisch gebundenes BPB detektiert, wodurch die Restbeladung mit Aminogruppen höher erscheint als sie tatsächlich ist. Die Abweichungen betragen zwischen 0,5 % und 3 % der Harzbeladung.

Zur Kontrolle der Kopplungen und Umsetzungen am Harz wurde die Massenanalyse verwendet. Eine kleine Menge Harz wurde mit TFA für 30 Minuten behandelt und das Rohprodukt direkt ohne Isolierung mit Maldi-Massenspektrometrie untersucht [Talbo et al., 1997]. Laut Literatur liefert die Methode schnell verfügbare und verlässliche Daten über die Kopplung. Bei der Durchführung stellte sich allerdings oft heraus, daß die aus den Ergebnissen gezogenen Schlüsse zur Vollständigkeit einer Kopplung nicht die wahren Verhältnisse widerspiegeln. So traten bei Synthesen, die laut Massenanalyse vollständig verlaufen zu sein schienen, nach Reinigung des fertigen Peptids auch unvollständige Sequenzen auf, z. T. im erheblichen Ausmaße. Diese offensichtliche Unterdrückung von Signalen ist bedingt durch die Tatsache, daß die zu analysierenden Substanzen nach Ionisierung aus einer kristallinen Matrix herausgelöst werden müssen. Da diese Freisetzung durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der Matrix nicht bei allen Substanzen in gleicher Quantität erfolgt, können Signale bestimmter Substanzen stärker oder schwächer auftreten, als es ihrem Vorliegen in der Probe entspricht. Daher können aus der

durchaus schnellen Methode nur Hinweise auf den Verlauf der Umsetzung gezogen werden, ohne den Anspruch auf Exaktheit.

4.1 Synthese der Sequenz 1 (Ac-A-A-E-G-G-S-X-N-V-F-S-K-NH₂)

Diese Sequenz ist abgeleitet von dem Peptid PKKAKRRRAEGGSSNVFS, das den Aminosäuren 1-17 des Proteins Myosin Light Chain (MLC) aus Skelettmuskeln entspricht. *In vivo* wird selektiv das Serin, das in der Teilsequenz hervorgehoben ist, durch die Myosin Light Chain Kinase (MLCK) phosphoryliert, ohne die anderen Serinreste zu verändern. Diese Phosphorylierung ist ein wichtiger Schritt bei der Initiierung von Muskelbewegungen [Michnoff et al., 1986]. Eine Abspaltung des Phosphatrestes findet unter anderem durch die magnesiumabhängige Proteinphosphatase 2C statt [McGowan und Cohen, 1987]. Ein dieser Phosphatase gegenüber hydrolysestabiles Derivat des Peptids kann als selektiver Affinitätsanker dienen und zur Aufreinigung des Enzyms verwendet werden. Bisher erfolgte die Reinigung der PP2C in Ermangelung eines solchen Derivats mit einer umständlichen Methode. Dazu wurde das komplette Protein MLC an Sepharose gekoppelt und anschließend enzymatisch thiophosphoryliert [Pato und Adelstein, 1980]. Ein vorgereinigter Zellextrakt wurde in einer Säule über das Material gegeben und die PP2C nach Waschen eluiert. Der Reinigungsfaktor dieses Schritts lag bei ca. 45. Eine alternative Methode war die Reinigung mit enzym-unspezifischen Standardverfahren der Enzymologie, wie Chromatographie über unbehandelte Sepharose oder Gelfiltration [Das et al., 1996].

Um die gezielte Immobilisierung des inhibitorischen Peptids an ein festes Trägermaterial zu ermöglichen, wurde die zu synthetisierende Sequenz C-terminal um ein Lysin erweitert und der N-Terminus wurde durch Einführung einer Acetylgruppe blockiert. Die ϵ -Aminogruppe des Lysins kann z. B. durch Bildung einer Amidbindung mit peptidchemischen Methoden an Carboxygruppen auf derivatisierten Trägern gekoppelt werden. Eine weitere Methode ist die Bildung von Schiffchen Basen durch Reaktion mit einem Aldehyd, bevorzugt Glutardialdehyd, der über die zweite Aldehydfunktion mit dem eigentlichen Träger verknüpft ist.

Von dieser Sequenz sollten neben der unphosphorylierten Sequenz zu Vergleichszwecken das Phosphat, das Phosphat-Phosphonat- sowie das Hydroxyphosphonatderivat unter Verwendung

der Festphasenmethode chemisch synthetisiert werden. Die Eignung des Phosphat-Phosphonat- bzw. Hydroxyphosphonat-Derivates sollte mit der alkalischen Phosphatase als unspezifischem Enzym untersucht werden.

4.1.1 Synthese der unphosphorylierten Sequenz 1.0

Die Peptide wurden in acetylierter und nicht acetylierter Form synthetisiert und als Vergleichssubstanz für NMR-Spektren oder für Peptidsequenzierungen eingesetzt.

Beide Peptide ließen sich unter Verwendung von Doppelkopplungen sowie verlängerten Reaktionszeiten von 60 Minuten in sehr guter Ausbeute (80 % bis 90 %) und hoher Reinheit gewinnen, so daß eine Reinigung nicht erforderlich war.

4.1.2 Synthese der phosphorylierten Sequenz 1.1

Zur Einführung der Phosphatgruppe dienen hauptsächlich zwei Varianten: die *globale Phosphorylierung* [Bannwarth und Trzeciak, 1987] und die Synthese mit einem kommerziell erhältlichen vorphosphorylierten Aminosäurebaustein [Wakamiya, 1994]. Beide Verfahren haben ihre Vor- und Nachteile und werden im folgenden erläutert.

4.1.2.1 Synthese mit globaler Phosphorylierung

Bei dieser Variante wird das Peptid zunächst auf dem Träger mit einem in der Seitenkette ungeschützten Serin an der entsprechenden Stelle synthetisiert, die anderen Serine werden geschützt eingebaut. Das Peptid wird vorerst nicht vom Harz abgespalten, sondern am ungeschützten Serin phosphoryliert. Mit Hilfe eines Phosphoramidits wird dabei das Peptid zum korrespondierenden Phosphit umgesetzt und anschließend zum Phosphat oxidiert. Erst jetzt finden die Abspaltung des Peptids vom Träger und die Isolierung statt. Aufgrund der Tatsache, daß mit diesem Verfahren prinzipiell alle ungeschützten Hydroxylseitenketten in die Phosphate überführt werden können, wird es als globale Phosphorylierung bezeichnet.

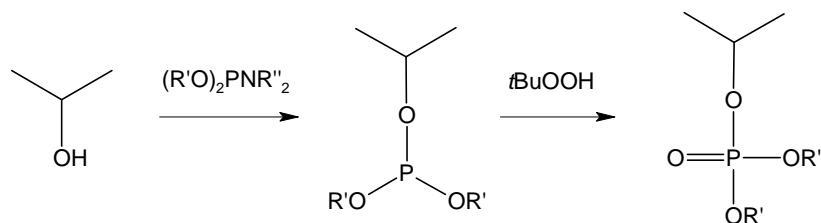


Abb. 4.1: Globale Phosphorylierung von Peptiden

Der Vorteil dieser Synthesestrategie liegt darin, daß aus einem Ansatz sowohl das unphosphorylierte als auch das phosphorylierte Peptid gewonnen werden kann. Die Nachteile liegen darin, daß die zusätzliche Kopplung unvollständig verlaufen kann, und daß es zu Nebenreaktionen, wie Umlagerung des intermediären Phosphits, kommen kann.

Die Synthese der unphosphorylierten Sequenz am Träger mit dem ungeschützten Serin verlief unproblematisch. Bei Probeabsaltungen und Massenanalyse des Peptids gab es keine Hinweise auf Nebenreaktionen wie Verzweigungen, die an der Hydroxylfunktion des Serins durch Veresterung mit der aktivierten Aminosäure stattgefunden haben könnten. Das N-terminale Alanin wurde mit dem Baustein Ac-Ala eingeführt, um die Gefahr der Acylierung in der Serinseitenkette beim Cappen mit Acetanhydrid auszuschließen. Für diese Kopplung ergab die Bestimmung der nicht umgesetzten Aminogruppen mit BPB-Test eine Kopplungsausbeute von 95 %.

Obwohl die anschließende Umsetzung des harzgebundenen Peptids mit der Base Tetrazol und Di-*tert*-butyl-N,N'-diethylphosphoramidit unter Argon für 24 Stunden durchgeführt wurde, ergab sich nach Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid für 43 Stunden laut Probespaltung und Massenspektrum nur ein geringer Phosphorylierungsgrad. Aufgrund dessen war eine Wiederholung der Umsetzung unter gleichen Bedingungen notwendig. Da eine erneute Analyse auf eine vollständige Umsetzung schließen ließ, wurde das Peptid vom Träger abgespalten und gereinigt. Neben dem Phosphat in 55 % Ausbeute wurde ein zweites Produkt isoliert (ca. 17 %), das laut Massenspektrum dem durch Umlagerung auf der Stufe des Phosphits gebildeten *H*-Phosponat entspricht und sich vom gewünschten Produkt nicht vollständig trennen läßt.

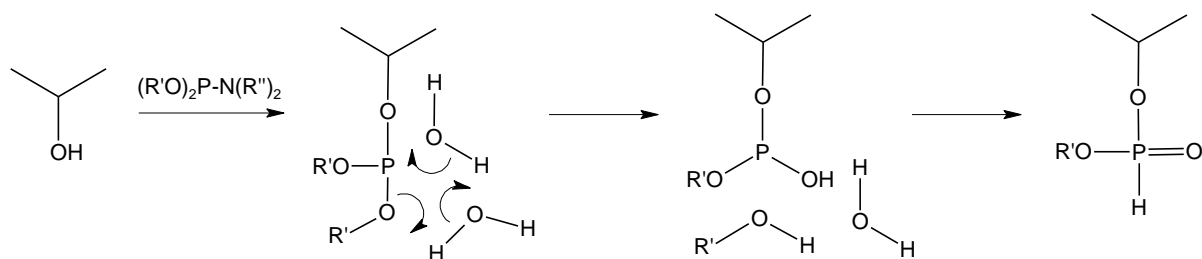


Abb. 4.2: Nebenreaktion bei der globalen Phosphorylierung

Diese Nebenreaktion ist gut untersucht [Xu et al., 1996], ließ sich aber hier aufgrund der benötigten langen Reaktionszeit nicht vermeiden.

4.1.2.2 Synthese mit einem vorphosphorylierten Aminosäurebaustein

Die zweite Variante zur Synthese des Phosphopeptids bedient sich eines vorphosphorylierten Bausteins, der in Form des monobenzylgeschützten Derivates Fmoc-Ser[P(O)(OH)(OBzl)] kommerziell erhältlich ist. Dadurch entfällt die lange Reaktionszeit unter Einwirkung des reaktiven Phosphoramidits und die Möglichkeit zur Umlagerung in das Phosphonat. Diese Methode wurde erst spät in die Peptidchemie eingeführt. Anfangs wurde bei Verwendung des ungeschützten Phosphoserins festgestellt, daß es während der Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppe auch zur Abspaltung des Phosphats kam. Die zum Dehydroalanin führende Nebenreaktion verläuft wie die Abspaltung der Fmoc-Gruppe über einen β -Eliminierungsmechanismus. Etliche Versuche, diese Nebenreaktion durch Schutz der Phosphatgruppe zu verhindern, brachten keinen Erfolg. Erst mit der Entwicklung des monobenzylgeschützten Bausteins gelang die Einführung des Phosphoserins in guten Ausbeuten ohne nennenswerte Bildung des Dehydroalanins [Wakamiya, 1994]. Inzwischen sind diese Derivate ebenfalls vom Threonin und Tyrosin erhältlich, wobei das ungeschützte Fmoc-Tyrosinphosphat wegen der fehlenden Möglichkeit zur β -Eliminierung schon davor eingesetzt werden konnte. Da eine Phosphorsäuregruppe frei vorliegt, muß ein zusätzliches Äquivalent Base zugegeben werden.

Bei Durchführung der Reaktion war festzustellen, daß die Kopplung des Derivates mit herabgesetzter Geschwindigkeit verlief. Nach einer Reaktionsdauer von 12 Stunden ließ eine Probespaltung mit Massenanalyse auf vollständigen Umsatz schließen. Nach Isolierung des Phosphopeptids ergab sich jedoch nur eine Ausbeute von 32 %. Die übrigen Peptide bestehen aus Fehl- oder Teilsequenzen, bei denen die Phosphat-Aminosäure nicht in das Peptid eingebaut wurde.

4.1.3 Versuche zur Synthese der thiophosphorylierten Sequenz 1.2

Die Einführung der Thiophosphatgruppe sollte mit der Methode der globalen Thiophosphorylierung erreicht werden. Analog zum Phosphat (s. Kap. 4.1.2.1) wird zunächst die Sequenz mit einem ungeschützten Serin an der gewünschten Stelle synthetisiert. Anschließend erfolgt die

Umsetzung mit einem Phosphoramidit zum entsprechenden Phosphit. Statt der Oxidation zum Phosphat wird mit Schwefelübertragungsreagenzien [Rao et al., 1992] der Schwefel eingeführt, und das Thiophosphat-Peptid wird abgespalten und isoliert [Kitas et al., 1992; Tegge, 1994].

Die Synthese der harzgebundenen nicht thiophosphorylierten Sequenz verlief wie beim Phosphat laut Probespaltung und Massenanalyse unproblematisch und das Peptid wurde mit Di-*tert*-butyl-N,N'-diethylphosphoramidit und *in situ* mit dem in quantitativer Ausbeute nach Rao synthetisierten Schwefelübertragungsreagenz Dibenzoyltetrasulfid umgesetzt. Bei Analyse des Rohprodukts sowie des gereinigten Produkts durch Massenspektroskopie erwies sich das Hauptprodukt als Phosphat, die Bildung von Thiophosphat konnte nicht nachgewiesen werden. Weitere Nebenprodukte konnten als *H*-Phosphonat und als unphosphoryliertes Peptid identifiziert werden. Als alternatives *S*-Übertragungsreagenz wurde 3*H*-1,2-Benzodithiol-3-one-1,1-dioxid getestet, welches auch in der automatischen Synthese von thiophosphorylierten Oligonukleotiden etabliert ist und ein besseres Löslichkeitsverhalten zeigt [Iyer et al., 1990]. Dazu wurde die Phosphoramiditlösung abfiltriert und das Harz in einem Plastikgefäß mit 5 Äquivalenten Reagenz umgesetzt, da sich das Reagenz im Kontakt mit Glas zersetzt. Aber sowohl durch dessen Verwendung als auch durch Umsetzung mit längere Reaktionszeiten und unter sorgfältigen Ausschluß von Sauerstoff konnte das Thiophosphat nicht erhalten werden. Daher mußte auf eine Verwendung dieses Derivates verzichtet werden.

4.1.4 Synthese der Phosphat-Phosphonat-Peptide 1.3a und 1.3b

Die Synthese wurde sowohl mit dem Ethylderivat **4a** als auch mit dem Isopropylderivat **4b** zur Verfolgung aller Kopplungsausbeuten zunächst manuell mit TBTU als *in situ*-Aktivator durchgeführt. Zusätzlich zu einem BPB-Test im Anschluß an jede Kopplung, die entsprechend dem Ergebnis des Tests wiederholt bzw. deren Fehlsequenzen durch Cappen mit Acetanhydrid terminiert wurden, erfolgte bei dem Ethylderivat **4a** nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe eine Beladungsbestimmung, ebenfalls durch BPB-Test.

Wie aus Abbildung 4.3 hervorgeht, verliefen die Kopplungen mit überwiegend ähnlichen Ausbeuten. Bei der Kopplung der Phosphat-Phosphonat-Derivate **4a** bzw. **4b** wurde in beiden Fällen eine langsamere Reaktion festgestellt: nach einer Reaktionszeit von 60 bzw. 90 Minuten

lagen noch 18 % bzw. 21 % aller Aminogruppen frei vor, diese Werte konnten durch Doppelkopplung für weitere 60 bzw. 90 Minuten auf 14 % bzw. 12 % gesenkt werden. Erst durch Cappen reduzierte sich die Restbelegung auf das durchschnittliches Maß von 3 % bis 5 %.

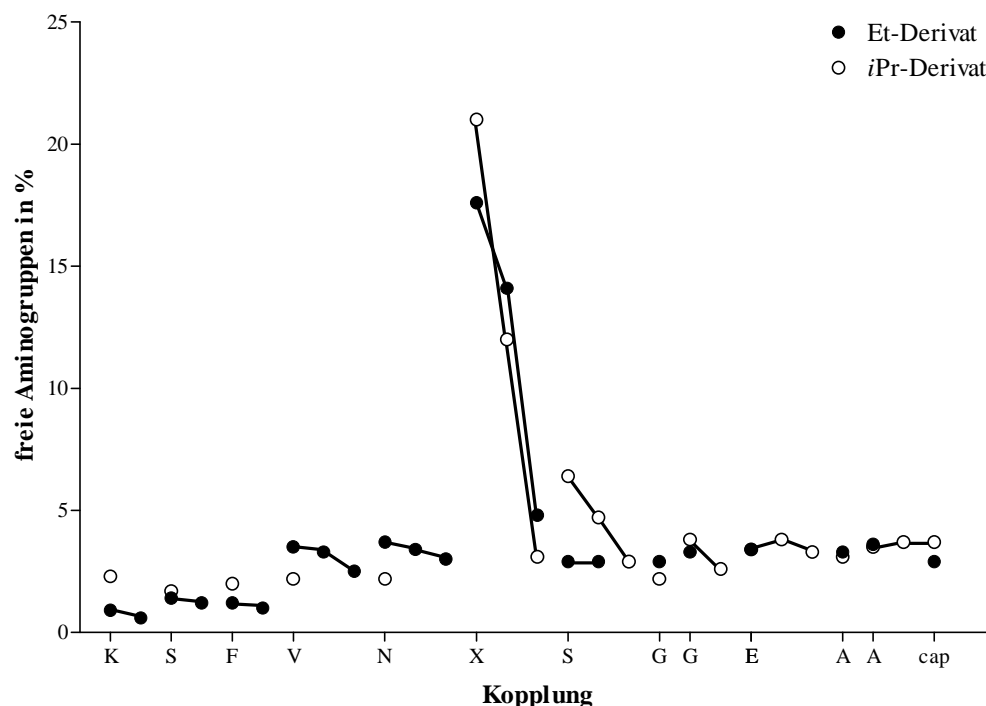


Abb. 4.3: Kopplungsverlauf bei den Synthesen der Peptide **1.3a** (●) und **1.3b** (○), Bestimmung durch Bromphenolblau-Test, Dauer der Kopplungen bzw. des Cappings sowie weitere Bedingungen s. Kap. 7.4.4.1

Für das Isopropylderivat **4b** wurde eine ebenfalls verlangsamte Kopplung der folgenden Aminosäure Ser⁶ festgestellt. Hier waren zur „vollständigen“ Umsetzung (ca. 3 % freie Aminogruppen) eine Dreifachkopplung und eine Gesamtreaktionszeit von 16 Stunden erforderlich. Alle nachfolgenden Kopplungen verliefen erneut mit guten Ausbeuten.

Die beobachtete Verschlechterung der Kopplungseffizienz ist sehr wahrscheinlich auf die sterisch anspruchsvolle Phosphat-Phosphonatgruppierung zurückzuführen. Es ist von einigen Aminosäuren bekannt, daß sie ebenfalls langsamer koppeln. Dies trifft insbesondere für Aminosäuren wie Isoleucin, Valin und Threonin zu, deren Seitenketten in β -Stellung verzweigen. Während die Tatsache der verlangsamten Kopplung an sich nicht überrascht, so ist das Ausmaß der Reduzierung doch unerwartet hoch. Dies spiegelt sich auch in der Peptidausbeute wieder: das ethylgeschützte Peptid **1.3a** wurde immerhin in 76 % Ausbeute, das isopropylgeschützte **1.3b** nur in 55 % Ausbeute isoliert.

Aus Abbildung 4.4 geht hervor, daß es bei fortschreitender Synthese des Peptids **1.3a** zu einer

stetigen leichten Abnahme der Gesamtbeladung des Harzes kam, die am Ende der Synthese auf 80 % des ursprünglichen Wertes abgesunken ist. Dieses Phänomen läßt nicht nur auf das Cappen zurückführen, das die nicht umgesetzten Aminogruppen für weitere Reaktionen unzugänglich macht, sondern ist als „Ausbluten“ bei dem verwendeten Syntheseträger eine systematische Erscheinung, die auch bei anderen Peptidsynthesen beobachtet wurde [Tegge und Frank, 1997].

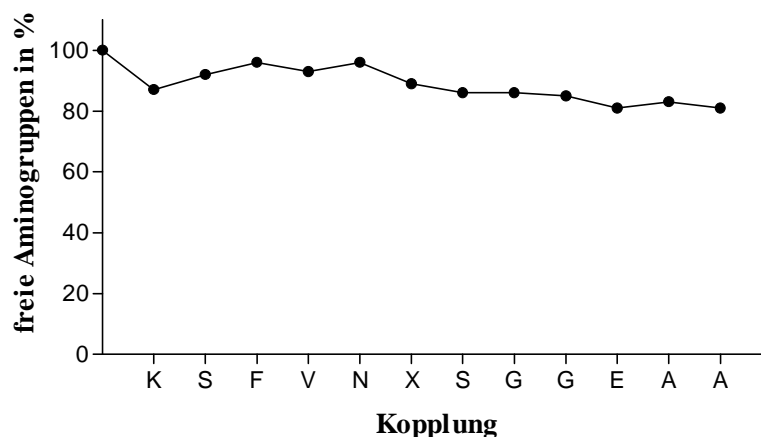


Abb. 4.4: Beladung des Harzes während der Synthese des Peptids **3a**, ermittelt durch Bromphenolblau-Test, die Startbeladung wurde als 100 % definiert

Vermutlich kommt es während der Synthese zur allmählichen Spaltung der Linker/Spacer-Verbindungen zum Träger oder zu der Spaltung des Trägermaterials selber.

Um die Kopplungsausbeute des Isopropylderivates **4b** zu steigern, wurde die Synthese wiederholt. Dabei wurden für die Kopplung des Derivates andere Aktivatoren verwendet, die laut Literatur [Angell et al., 1994; Garcia-Echeverria, 1995] bei schwierigen Kopplungen bessere Ergebnisse erzielen. Es wurden HATU sowie DIC/HOAt und zum Vergleich TBTU jeweils im Verhältnis 1:1 zur Aminosäure verwendet. Während TBTU und HATU mit der Aminosäure **4b** direkt umgesetzt wurden, mußte diese bei Verwendung von DIC/HOAt zunächst für 1 Stunde mit dem Reagenz voraktiviert werden. Im Verlauf der Synthese stellte sich laut Probespaltung und Massenanalyse kein Unterschied zwischen den Aktivierungsmethoden heraus. Abweichungen zeigten sich aber in der Reinheit und Ausbeute der Produkte: bei Verwendung von TBTU und HATU lag das gewünschte Peptid laut HPLC in 75 % bzw. 85 % Reinheit (Rohpeptid) vor, bei DIC/HOAt nur zu 55 %. Als Nebenprodukt konnte hauptsächlich die Sequenz ohne das Phosphat-Phosphonat identifiziert werden. Die Reinigung mit präparativer HPLC führte zu Ausbeuten des Zielpeptides **1.3b** von 55 % (HATU), 39 % (TBTU) bzw. 31 % (DIC/HOAt), was in der Tendenz den analytischen Verhältnissen entspricht. Aus den Experimenten ging

hervor, daß zur Kopplung des Isopropylderivats der Gebrauch von HATU die höchsten Ausbeuten an Peptid ergibt. Jedoch sollten für eine einigermaßen vollständige Umsetzung verlängerte Kopplungszeiten bzw. Doppelkopplungen verwendet werden.

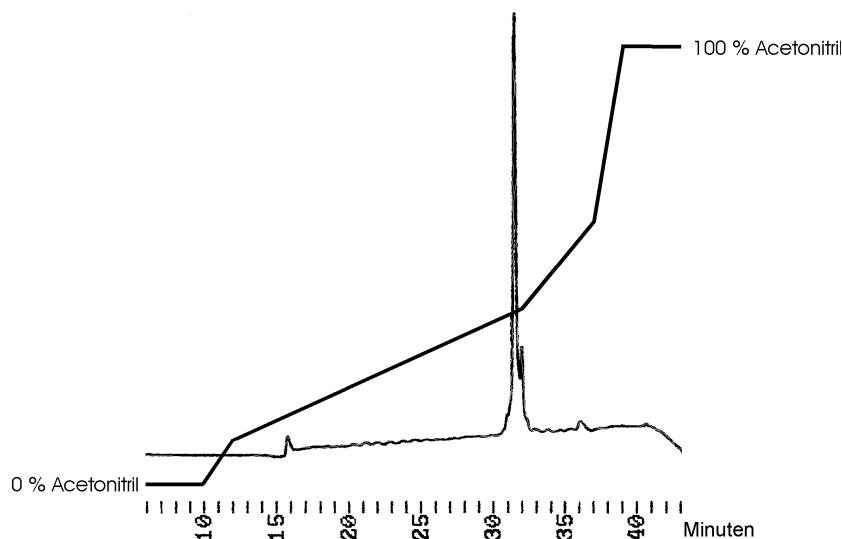


Abb. 4.5: HPLC des gereinigten Peptids **1.3b**, Trennbedingungen: C_{18} -Säule, 0 % bis 100 % Acetonitril + 0,1 % TFA gemäß des angegebenen Gradienten

4.1.5 Synthese der Hydroxyphosphonat-Peptide **1.4a** und **1.4**

Da es bei der Verwendung des nicht hydroxyl-geschützten Hydroxyphosphonat-Derivats **9a** während der Aktivierung mit TBTU zur Zyklisierung zum Lacton kommt, wurde die hydroxyl-tetrahydropyranyl- und phosphono-diisopropyl-geschützte Aminosäure **12a** eingesetzt. Die säurelabile THP-Gruppe sollte unter den sauren Bedingungen der TFA-Behandlung zur Abspaltung des Peptids vom Harz entfernt werden können. Die Synthese erfolgte wie auch schon beim Phosphat-Phosphonat in mehreren Ansätzen unter Verwendung von verschiedenen Kopplungsreagenzien bei der Kopplung der Hydroxyphosphonat-Aminosäure **12a**, um die Auswirkungen auf den Einbau zu untersuchen. Neben TBTU, HATU und DIC/HOAt wurden als klassischem Kopplungsreagenz DIC/HOBt und zusätzlich PyBOP verwendet. Alle Aktivatoren wurden im Verhältnis 1:1 zur Aminosäure eingesetzt, die Reaktionslösungen mit DIC/HOBt bzw. DIC/HOAt wurden für 30 Minuten vorinkubiert.

Probespaltungen und folgende Massenanalysen der einzelnen Ansätze nach 2 Stunden Kopplungsdauer zeigten in keinem der Versuche das Vorhandensein nicht umgesetzter Peptidketten. Ebenso wenig waren Unterschiede zwischen den Umsetzungen zu erkennen. Daher wurden alle

Ansätze nach dem Waschen vereinigt und gemeinsam weiter verwendet. Von dem Rohharz mit Peptid wurde ein Teil für die Abspaltung der Phosphorschutzgruppen [Fretz, 1996] entnommen. Die Hauptmenge wurde mit Abspatlösung behandelt und das phosphonatgeschützte Peptid ohne THP-Gruppe **1.4a** wurde in 23 % Ausbeute isoliert. Als „Nebenprodukt“ (ca. 50 % des Rohpeptids!) konnte nach Aufarbeitung die nicht umgesetzte Teilsequenz Asn⁸-Lys¹² mit HPLC, Massenspektrometrie und Aminosäureanalyse identifiziert werden. Diese Abbruchsequenz bzw. unvollständige Kopplung des Hydroxyphosphonats war bei der Probespaltung nicht zu erkennen und lieferte einen weiteren Hinweis auf die Fehleranfälligkeit der Analysenmethode.

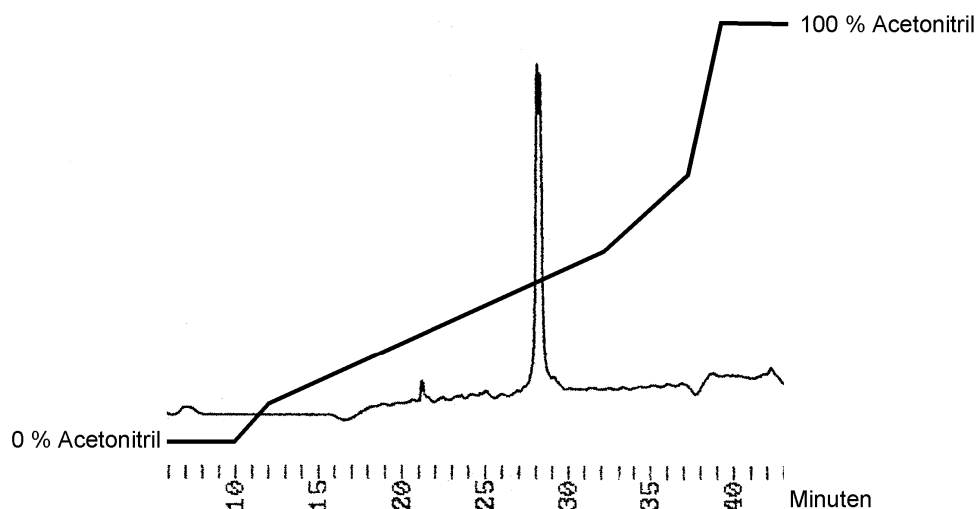


Abb. 4.6: HPLC des gereinigten Peptids **1.4a**, Trennbedingungen: C₁₈-Säule, 0 % bis 100 % Acetonitril + 0,1 % TFA gemäß des angegebenen Gradienten

Im Vergleich zu der Kopplung des isopropylgeschützten Phosphat-Phosphonats **4b** war bei der Kopplung des isopropylgeschützten Hydroxyphosphonats **12a** laut Massenanalyse kein Unterschied bei der Verwendung verschiedener Kopplungsreagenzien festzustellen. Auch verlief die Kopplung nicht so langsam wie dort (2 Stunden gegenüber 12 Stunden), was wahrscheinlich auf den geringeren Platzbedarf der vorliegenden Schutzgruppen zurückzuführen ist.

Der bei den Isopropylgruppen notwendige zusätzliche Schritt zur Abspaltung an der Phosphonatgruppe sollte aufgrund der dabei aufgetretenen Probleme umgangen werden. Dies gelang durch die Verwendung der *tert*-Butylgruppe, die bereits bei der allgemeinen Entschützung des Peptids abgespalten werden sollten. Da die Synthese des OH-tetrahydropyranylgeschützten Bausteins **12b** nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte (s. Kap. 3.2.9), wurde die Methoxyethoxymethyl-(MEM-)Gruppe, die gegenüber Säuren stabiler ist, zum Schutz der Hydroxylfunktion eingesetzt.

Die Kopplung eines Diastereomers des entsprechenden Derivates **12c** wurde im doppelten Überschuß mit TBTU als Aktivator über 18 Stunden durchgeführt und ergab nach Abspaltung und Reinigung das komplett entschützte Peptid **1.4** in 12 % Ausbeute. Als Nebenprodukt wurde ein Peptid identifiziert, in dem zwei Hydroxyphosphonat-Aminosäuren vorlagen. Dies ist vermutlich auf die teilweise Spaltung der Fmoc-Gruppe während der lange dauernden Kopplung zurückzuführen.

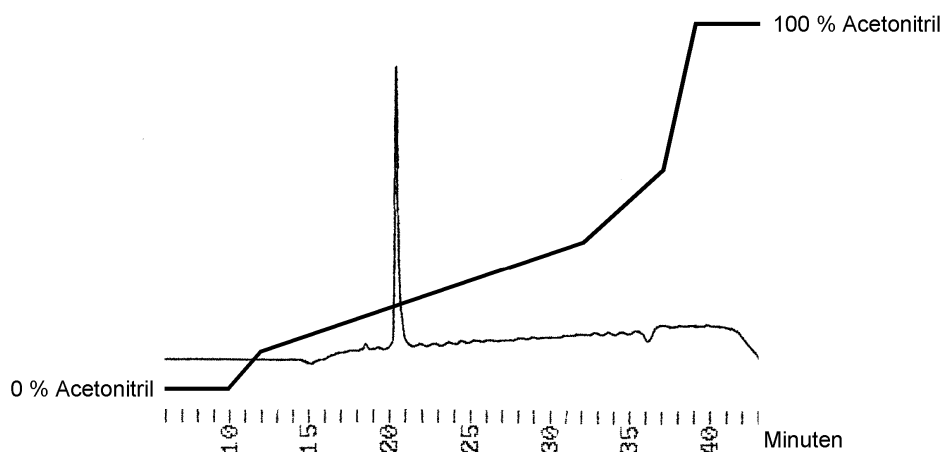


Abb. 4.7: HPLC des gereinigten Peptids **1.4**, Trennbedingungen: C₁₈-Säule, 0 % bis 100 % Acetonitril + 0,1 % TFA gemäß des angegebenen Gradienten

4.2 Synthese der Sequenz 2 (R-R-R-R-A-A-X-V-A-NH₂)

Da die Dephosphorylierung der Sequenz 1 durch die alkalische Phosphatase nur langsam verlief bzw. die Detektion des Phosphats wegen der Empfindlichkeitsgrenze des colorimetrischen Nachweises schwierig war, sollte eine zweite Sequenz synthetisiert und radioaktiv markiert werden. Durch die Verwendung von radioaktivem Phosphat liegt die Empfindlichkeit der Nachweismethode sehr viel niedriger. Des weiteren sollte die inhibitorische Wirkung der phosphat-analogen Peptide auf Proteinphosphatasen untersucht werden. Das Problem bei dem Gebrauch dieser Enzyme ist deren oft geringe Aktivität gegenüber Peptiden. Daher wurde die Sequenz RRRRAAXVA [Agostinis et al., 1990] ausgewählt, von der bekannt ist, daß die am Serin phosphorylierte Form (X = Phosphoserin) durch die Proteinphosphatase 2A mit guter Aktivität dephosphoryliert wird. Die Sequenz ist abgeleitet aus der Phosphorylierungsstelle der Pyruvat-Kinase Typ L, die das Serin an Position X⁷ dieser Sequenz phosphoryliert. Außerdem wird sie von der cAMP-abhängigen Proteinkinase PKA als Substrat akzeptiert, was die radioaktive Markierung ermöglicht. Dabei ist das Vorhandensein des Arginins an Position -3 (relativ zum Serin, R⁴ vom N-Terminus) für die Phosphorylierung essentiell, es fördert zudem die

Dephosphorylierung mittels Proteinphosphatasen PP2A. Letzteres wird durch weitere basische Aminosäuren C-terminal vom Phosphoserin (bis zu vier Arginine und/oder Lysine) noch verstärkt.

Von dieser Sequenz sollten das Phosphoserin- sowie das Hydroxyphosphonatderivat an fester Phase synthetisiert und letzteres auf seine Eignung als Inhibitor der PP 2A getestet werden. Um das Phosphopeptid in einem radioaktiven Assay einzusetzen, wurde eine kleine Menge enzymatisch phosphoryliert.

4.2.1 Synthese der phosphorylierten Sequenz 2.1

Analog zur Darstellung des entsprechenden Derivates der Sequenz 1 (s. Kap. 4.1.2) wurde dieses Peptid sowohl durch Bausteinsynthese als auch durch globale Phosphorylierung synthetisiert. Zusätzlich wurde das radioaktiv markierte Phosphat aus der unphosphorylierten Sequenz mit der katalytischen Untereinheit der PKA und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ als Cosubstrat gebildet [Agostinis et al., 1990].

4.2.1.1 Synthese mit globaler Phosphorylierung

Die Sequenz wurde ohne Optimierung der Kopplungsdauer mit seitenketten-ungeschütztem Serin synthetisiert und auf dem Harz belassen. Die Abspaltung einer Teilmenge des Peptids zum Zweck der enzymatischen Phosphorylierung ergab nach Reinigung das laut Aminosäureanalyse und Massenspektrometrie korrekte Produkt in 47 % Ausbeute. Aus der globalen Phosphorylierung am Harz mit Tetrazol und Di-*tert*-butyl-N,N'-diethylphosphoramidit unter Argon für 18 Stunden mit anschließenden Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid für 5 Stunden resultierte das Phosphopeptid nach HPLC-Reinigung in 93 % Ausbeute. Da bei enzymatischer Umsetzung des Produkts mit der Proteinphosphatase 2A keine Abspaltung des Phosphats zu erkennen war, wurde zunächst vermutet, daß die als Gegenion aus der HPLC-Reinigung vorhandene TFA das Enzym inhibiert. Zur Entfernung der TFA wurde ein Teil des Peptids über eine Gelfiltrations-säule mit Zusatz von Essigsäure gereinigt, um es in die Acetatform zu überführen. Jedoch wurde auch diese Peptidpräparation nicht von dem Enzym umgesetzt.

4.2.1.2 Synthese mit vorphosphoryliertem Baustein

Die manuelle Synthese unter Verwendung des Derivats Fmoc-Ser[P(O)(OH)(OBzl)]-OH führte bei einer Kopplungszeit von 2 Stunden für jede Aminosäure zu einer Ausbeute an Zielpeptid von 29 %, obgleich die nach jedem Schritt durchgeführte Reaktionskontrolle mit Probespaltung und Massenanalyse auf eine vollständigere Umsetzung schließen ließ. Als ein Teil der Nebenprodukte konnten Peptide mit Fehlsequenzen identifiziert werden.

4.2.1.3 Enzymatische Phosphorylierung

Die enzymatische Phosphorylierung der in löslicher Form vorliegenden Sequenz erfolgte durch die katalytische Untereinheit der cyclo-AMP-abhängigen Proteinkinase (PKA). Als Phosphatquelle diente eine radioaktive ATP-Lösung, die durch Mischen einer „kalten“ ATP-Lösung mit „heißer“ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -Stammlösung bereitete worden war. Von der Mischung wurde durch Scintillationsmessung der Zerfälle pro Minute (counts per minute, cpm) die spezifische Radioaktivität ermittelt, um später die Menge an Peptid bzw. freiem Phosphat zu ermitteln. Sie betrug $2,57 \cdot 10^5$ cpm pro nmol Phosphat. Der Kinase-Puffer enthielt neben 100 mM MOPS, 2 mM Mg^{2+} , 0,8 mM EGTA und 2 mg/ml BSA noch 400 mM Natriumchlorid zur Unterdrückung von unspezifischen ionischen Wechselwirkungen des Peptids mit dem ATP. Die Phosphorylierung wurde bei einer Peptidkonzentration von 0,5 mM mit 2,4 μg cAMP-Kinase (entspr. ca. 14,4 mU) bei einer ATP-Konzentration von 2,25 mM für 3 Stunden bei 30 °C durchgeführt, anschließend wurde die Reaktion mit Eisessig gestoppt und das überschüssige ATP sowie das gebildete ADP mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule entfernt. Die Bedingungen der Phosphorylierung entsprechen im wesentlichen der Literaturvorschrift [Agostinis et al., 1990], als wichtigste Unterschiede werden dort 100 μM ATP und 1,6 mU (ca. 0,3 μg) der PKA verwendet. Durch Bestimmung der Radioaktivität des Eluats ergab sich ein Phosphorylierungsgrad von 69 % (in der Literatur 30 % bis 40 %). Diese Abweichung kann mit einer nicht vollständigen Abtrennung des „heißen“ ATPs oder dem Einsatz höherer Mengen an ATP bzw. Kinase erklärt werden.

4.2.2 Versuch zur Synthese der thiophosphorylierten Sequenz 2.2

Dieses Peptid sollte mit einer zur prinzipiellen Synthesemethode des entsprechenden Thiophosphat-Peptids der Sequenz 1 (s. Kap. 4.1.3) analogen Reaktionsfolge durch globale Thiophosphorylierung dargestellt werden. Zur Einführung des Schwefels in die Phosphit-Zwischenstufe wurde hier 3*H*-1,2-Benzodithiol-3-one-1,1-dioxid verwendet.

Bis zum Phosphit verlief die nicht optimierte Umsetzung ohne erkennbare Probleme. Die Reaktionslösung wurde abfiltriert, das Harz in ein Plastikgefäß überführt und mit 5 Äquivalenten des Schwefelübertragungsreagenzes für 5 Stunden umgesetzt. Das Peptid wurde abgespalten und isoliert. In der Massenanalyse des Produkts zeigte sich analog zu Kapitel 4.1.3, daß auch hier das Thiophosphat nicht entstanden war. Als Hauptprodukt konnte ebenfalls das Phosphat identifiziert werden, allerdings in geringer Ausbeute und Reinheit. Diese Peptidpräparation wurde nicht im weiteren Verlauf verwendet.

4.2.3 Synthese des Hydroxyphosphonat-Peptids 2.3

Als Hydroxyphosphonat-Derivat wurde die hydroxyl-tetrahydropyranyl- und phosphono-isopropylgeschützte Fmoc-Aminosäure **12a** eingesetzt. Die Kopplungen erfolgten bei dem Hydroxy-phosphonat im dreifachen Überschuß für 20 Stunden bzw. bei allen übrigen im vierfachen Überschuß für 2 Stunden, jeweils mit einem Äquivalent TBTU und zwei Äquivalenten DIEA. Probespaltung und Massenanalyse der einzelnen Kopplungen deuteten auf vollständigen Umsatz hin. Nach Abspaltung und Reinigung wurde das Peptid ohne THP-Gruppe in 25 % Ausbeute erhalten. Laut Massenspektrometrie war es mit dem um ein Arginin kürzeren Peptid verunreinigt.

Da bei der Umsetzung des regulären Phosphats dieser Sequenz mit der Proteinphosphatase 2A keine Freisetzung von Phosphat zu erkennen war und deshalb keine kinetischen Untersuchungen durchgeführt werden konnten, wurden keine Versuche zur Entschützung des Hydroxyphosphonats durchgeführt.

4.3 Entschützung der Peptide

4.3.1 Zusammenfassung der bereits publizierten Methoden

Wie in Kapitel 3.1 erläutert, wurden die Phosphat- und Phosphonatgruppen in den Aminosäuren während der Peptidsynthese als Ethyl-, Isopropyl- oder *tert*-Butylester geschützt. Um die Phosphonopeptide in biologischen Experimenten, wie z. B. einer Inhibitionskinetik, einsetzen zu können, müssen diese Tri- bzw. Diester zu den freien Säuren in der Aminosäureseitenkette umgesetzt werden.

Zur Abspaltung der Alkylester wird bevorzugt die Acidolyse verwendet. Dabei wird die P=O-Gruppe durch sehr starke Säuren wie Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) oder Fluorwasserstoff (HF) am Sauerstoff protoniert, und das Intermediat zerfällt unter Eliminierung eines Alkylkations zu dem um einen Substituenten verringerten Ester. Da beide Estergruppen unter diesen Bedingungen in der Regel nur geringe Reaktivitätsunterschiede aufweisen, wird auch der zweite Ester gespalten, und es wird die freie Säure gebildet. Die Eliminierung aus den Intermediaten verläuft besonders leicht, wenn nach einem S_N1-Mechanismus ein resonanzstabilisiertes Kation, z. B. ein *tert*-Butyl- oder Benzylkation, entstehen kann, das im weiteren mit einem Nukleophil abreagiert. Ist die Möglichkeit der Stabilisierung nicht gegeben, so wird ein starkes Nukleophil benötigt, um nach einem S_N2-Mechanismus an der Alkylgruppe unter Freisetzung der Säuregruppe anzugreifen.

Neben der Acidolyse können die Ester auch mit einer Lewis-Säure in Verbindung mit einem Nukleophil umgesetzt werden. In der Regel werden Trimethylsilyl-(TMS-)Derivate eingesetzt, die in einer ersten Stufe durch Umesterung die Alkyl- in die Trimethylsilylester überführen. Das beteiligte Nukleophil stammt dabei entweder aus dem TMS-Derivat selber (TMS-Iodid, -Bromid) oder wird zusätzlich eingesetzt (Thioanisol). Unter geeigneten Bedingungen können durch ³¹P-NMR-Spektroskopie alle auftretenden Intermediate nachgewiesen werden [Tong et al., 1992]. In der zweiten Stufe werden die TMS-Ester mit Wasser oder Methanol zu der freien Phosphor- bzw. Phosphonsäure hydrolysiert.

Der Unterschied in der Stabilität der Methyl- und Ethylester gegenüber der Acidolyse bzw. Lewis-Säure-Behandlung ist relativ gering. Folglich gelten die in der Literatur beschriebenen Methoden und Bedingungen fast unverändert für beide Schutzgruppen und werden daher

gemeinsam behandelt. Da in den meisten Fällen die Verwendung dieser Gruppen zum Erfolg führte, sind nur wenige Angaben zu der ungebräuchlichen, aber im Falle dieser Arbeit getesteten Isopropylgruppe publiziert. Ähnlich verhält es sich mit der *tert*-Butylgruppe, die jedoch schon während der Abspaltung des Peptids vom Harz und der allgemeinen Entschützung abgespalten werden kann und aus diesem Grund vielfach eingesetzt wird.

Die Verwendung der sehr starken Säuren TFMSA und HF zur Seitenketten-Entschützung von Peptiden in der Boc-Taktik ist lange bekannt und gebräuchlich. Bei der Entschützung von Phosphorsäure- bzw. Phosphonsäuremethyl- und -ethylestern muß zusätzlich ein Nukleophil eingesetzt werden, um die Alkylgruppe abzuspalten (siehe oben). Insbesondere die nach Pearson „weichen“ Nukleophile Thioanisol (TA) und Dimethylsulfid (DMS) werden verwendet. Dabei erwies sich der Gebrauch von HF/DMS (9:1 bzw. 1:3) wegen der auftretenden Dephosphorylierung der tyrosin-analogen Seitenkette von bis zu 90 % als ungeeignet [Kitas et al., 1988]. Als Alternative wurden Mischungen aus 1:5:3:1 TFMSA/TFA/m-Cresol/Thioanisol ([Kitas et al., 1990], 52 % Ausbeute) bzw. DMS ([Valerio et al., 1989], 15 % Ausbeute) eingesetzt, wobei mit Thioanisol kürzere Reaktionszeiten (1 Stunde bzw. 4 Stunden) beobachtet wurden. Dies ist vermutlich auf die bessere Fähigkeit des Thioanisols zur Delokalisierung der zwischenzeitlich auftretenden positiven Ladung zurückzuführen.

Eine weitere Methode der Acidolyse ist die Behandlung des Peptids mit HBr (42 % in AcOH), wobei das Bromid als „weiches“ Nukleophil dient. Bei dieser Methode wurden lange Reaktionszeiten bis 20 Stunden benötigt, um beide Alkylgruppen (hier Ethyl-) abzuspalten ([Yang et al., 1994], 80 % Ausbeute). Bei kürzerer Zeit war die Umsetzung unvollständig, bei längerer Zeit kam es zu Spaltung von Peptidbindungen.

Die Entschützung mit TMS-Derivaten ist nach Anzahl der Nennungen in der Literatur die am häufigsten eingesetzte Methode, um Phosphor- bzw. Phosphonsäureester zu spalten. Als Silylierungsreagenz dienen das TMS-Triflat sowie die Halogenderivate TMS-Br und TMS-I, wobei letzteres aus TMS-Cl und Natriumiodid *in situ* hergestellt werden kann [Olah et al., 1979]. Bei der Entschützung von Di- oder Tripeptiden reichte die Nukleophilie des Bromids in einer 30%igen Lösung von TMS-Br in Acetonitril für 40 Minuten aus, um das Phosphonat in die Säure zu überführen. Dagegen wurden längere Peptide nur teilweise entschützt. Dies konnte durch eine Lösung von TMS-Br und Thioanisol in TFA (jeweils 1 M) und eine Reaktionszeit von 12 Stunden mit anschließender Hydrolyse mit Wasser erreicht werden [Tong et al., 1992].

Ebenfalls über mehrere Stunden verlief die Spaltung mit 1 M TMS-Br in TFA mit 10 mM m-Cresol (6 Stunden, 75 % Ausbeute), 1 M TMS-Br/1 M Thioanisol in TFA mit 10 mM m-Cresol (10 Stunden, 74 % Ausbeute) sowie 1 M TMS-OTf/1 M Thioanisol in TFA mit 10 mM m-Cresol (22 Stunden, 53 % Ausbeute), jeweils nach Methanolhydrolyse [Kitas et al., 1990; Kitas et al., 1989].

Die Verwendung von Thioanisol oder Dimethylsulfid besitzt folgende Nachteile: zum einen weisen beide Substanzen einen unangenehmen Geruch auf, zum anderen geben sie bei Reaktionskontrolle mit HPLC sehr breite Peaks, die die Edukt- oder Produktpeaks leicht überlagern können. Als entscheidender Nachteil ist jedoch die lange Reaktionszeit anzusehen. Daher wurde das Silylierungsreagenz gegen das stärker nukleophile TMS-Iodid ausgetauscht und die Methode der Reaktion leicht abgewandelt. So konnte das vollständig entschützte Produkt durch vorsichtiges Versetzen einer Suspension des ethylgeschützten Peptids in Acetonitril mit TMS-I nach 2 Stunden durch Hydrolyse mit 10%iger Essigsäure in 50 % Ausbeute erhalten werden [Green, 1994]. In einer anderen Sequenz [Yang et al., 1994] trat jedoch bei Behandlung mit TMS-I bereits nach 15 Minuten Spaltung des Peptids auf, was auf eine zu hohe Reaktivität des Iodids hinweist. Auch ist diese Methode aufgrund der geringen Löslichkeit der Peptide in Acetonitril mit Risiken behaftet.

Ein alternatives Verfahren ist die Entschützung des Peptids noch im harzgebundenen Stadium [Fretz, 1996]. Das Harz mit der komplett geschützten Sequenz wurde in Acetonitril suspendiert und mit TMS-I versetzt. Nach 4 Stunden wurde der Überstand abfiltriert, das Harz gewaschen und das Peptid abgespalten. Problematisch bei diesem Verfahren ist die fehlende Reaktionskontrolle sowohl der Peptidsynthese als auch des Verlaufs der Entschützung.

Für die Abspaltung der Isopropylgruppen aus den Phosphonsäureestern können im Prinzip die gleichen Verfahren wie für die Methyl- und Ethylderivate angewendet werden. Es wurde zunächst vermutet, daß sich die Isopropylgruppen unter milderen Bedingungen abspalten lassen. In der Literatur ist eine Methode speziell zur Entschützung bei Isopropylgruppen beschrieben [Salomon und Breuer, 1995]. Dabei wurde das Edukt in Dioxan mit TMS-Br versetzt und auf 60 °C erwärmt. Durch Einengen der Lösung und Versetzen des Rückstands mit NaOH (0,5 Äquivalente) ließ sich das Produkt als Mononatriumsalz gewinnen. Allerdings wurden nur Aminosäuren als Edukte getestet, die postulierte Übertragbarkeit auf Peptide ist noch nicht nachgewiesen worden.

Diese Schwierigkeiten bei der nachträglichen Entschützung der Peptide läßt sich vermeiden, wenn als Schutz der Phosphonsäure die *tert*-Butylgruppe verwendet wird. Bei der Abspaltung des Peptids vom Harz wird sie parallel zu den anderen Schutzgruppen abgespalten, so daß kein zusätzlicher Schritt benötigt wird. Diese Anwendung beschränkt sich allerdings auf Aminosäurederivate und Peptidsynthesen, in deren Syntheseverlauf keine Säurebehandlung notwendig ist. Die *tert*-Butylgruppe kann durch milde Säuren abgespalten werden, unter Umständen bereits bei Verwendung von TFA-haltigen HPLC-Laufmitteln oder bei Hydrierung in Essigsäure. Wird auf die Vermeidung solcher kritischen Schritte bzw. deren Kontrolle geachtet, so lassen sich die Peptide ohne zusätzlichen Aufwand zur Entschützung synthetisieren [Perich und Reynolds, 1991]. Dieses vorteilhafte Verfahren ist nicht anwendbar in der Boc/Benzyl-Taktik oder bei Auftreten von sterischen Problemen durch die sperrigen *tert*-Butylgruppen in der Synthese.

4.3.2 Entschützung des Phosphat-Phosphonat-Peptids **1.3a** bzw. **1.3b**

In einer früheren Arbeit in dieser Arbeitsgruppe wurde das Ethylderivat des Phosphat-Phosphonats dargestellt und ein erster Versuch zur Entschützung des entsprechenden Peptids **1.3a** unternommen [Wiemann, 1995]: Bei der Verwendung von 1 M TMS-Br und 0,17 M Thioanisol in TFA bei 0 °C für 12 Stunden konnte keine Umsetzung beobachtet werden. Nach weiteren 12 Stunden bei RT war die Umsetzung abgeschlossen, es wurde mit Wasser hydrolysiert und aufgearbeitet. Die Analyse des Rohprodukts ergab eine komplexe Mischung, in der laut Massenspektrum kein Peptid mit der Masse des vollständig oder teilweise geschützten Peptids zu erkennen war. Statt dessen konnten die erhaltenen Massen Teilstücken des entschützten Peptids zugeordnet werden. Es fanden neben der gewünschten Abspaltung der Schutzgruppen zusätzlich Spaltungen an Peptidbindungen statt, durch die Massenanalyse wurde als bevorzugte Bindung die zwischen den Positionen 7 und 8 identifiziert, also zwischen der Phosphonat-Aminosäure und dem nachfolgenden Asparagin.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Synthese des ethylgeschützten Peptids **1.3a** wiederholt und andere Methoden zur Entschützung getestet.

In Variante 1 wurde unter Verwendung von 40 % HBr in Eisessig [Yang et al., 1994] schon bei kurzer Reaktionsdauer ebenfalls die Massen der selben Peptidbruchstücke erkennbar. Da die

Umsetzung des ethylgeschützten Aminosäure-Derivates **3a** unter gleichen Bedingungen keine Entschützung erkennen ließ, wurde diese Methode ebenfalls als nicht geeignet eingestuft.

Als zweite Variante bot sich die Verwendung von TFMSA und Thioanisol in TFA an [Kitas et al., 1990]. Aber auch hier konnte bei der Umsetzung des Aminosäurederivates **3a** mit TFMSA/Thioanisol/TFA 1:3:6 für 1 Stunde keine Reaktion zum gewünschten Produkt festgestellt werden, im ^1H -NMR-Spektrum traten weiterhin die Signale der Ethylgruppen auf.

Aus den Ergebnissen mußte gefolgert werden, daß die Ethylgruppen zu stabil gegenüber den getesteten Bedingungen sind bzw. es in hohem Maße zu Nebenreaktionen kommen kann. Da dieses Problem bei anderen Peptiden laut Literatur nur in einem Fall auftrat bzw. publiziert wurde, mußte die hier beobachtete Zersetzung des Peptids auf die vorliegende Sequenz zurückgeführt werden. Aus diesen Gründen wurde auf eine weitere Verwendung dieser Schutzgruppe verzichtet.

Als säurelabilere Schutzgruppen stehen die Isopropyl-, die *tert*-Butyl- und die Benzylgruppe zur Auswahl. Es gelang jedoch nicht, die beiden letzteren in eine Phosphat-Phosphonatstruktur einzubauen (s. Kap. 3.1.3), so daß nur die Isopropylgruppe auf ihre Verwendung hin getestet werden konnte. Da in der Literatur die Abspaltung dieser Gruppe nur aus Aminosäurederivaten unter Erhitzen mit TMS-Br in Dioxan bekannt und die Übertragbarkeit auf Peptide nicht gewährleistet ist, mußten neue Bedingungen für die Umsetzung gefunden werden.

Als Vorversuch wurde die Reaktion der isopropylgeschützten Aminosäure **3b** mit 10 % TFMSA in TFA untersucht. Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden wurde mit Wasser hydrolysiert und das Produkt mit NMR-Spektroskopie analysiert: laut ^1H -NMR sind die Isopropylgruppen nicht mehr vorhanden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde das Peptid **1.3b** mit isopropylgeschütztem Phosphat-Phosphonat synthetisiert und mit verschiedenen Konzentrationen des Reagenzes sowohl mit als auch ohne Verwendung von Wasser oder Thioanisol als Nukleophil [Kitas et al., 1990; Valerio et al., 1989] umgesetzt (Variante 1, Tab. 4.1 und 7.3).

Tabelle 4.1: Abspaltung der Isopropylgruppen aus Peptid **1.3b**, Variante 1: TFMSA bei RT

TFMSA	Nukleophil 1	Nukleophil 2	Zeit	Erfolg
1 %			24 h	unvollständig entschützt (uv)
5 %			4 h	vollständig, teilw. Dehydratisierung (- H ₂ O)
10 %			1 h	uv, teilw. - H ₂ O
3 %	H ₂ O, 1 %		2 d	keine Reaktion
5 %	H ₂ O, 1 %		3 h	vollständig, teilw. - H ₂ O
5 %	H ₂ O, 5 %		1,5 h	uv, andere Nebenreaktionen
1 %		DMS, 3 %	1 d	vollständig, teilw.- H ₂ O
20 %		DMS, 10 %	2 d	keine Massen erhalten, verm. zer- setzt
1 %		TA, 3 %	1 h	uv, teilw.- H ₂ O
5 %	H ₂ O, 5 %	TA, 5 %	4 d	uv, teilw. - H ₂ O

Als Kontrolle über den Verlauf der Reaktionen wurden aus den Ansätzen Proben entnommen und ohne Aufarbeitung direkt mit Massenspektrometrie analysiert. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von Wasser oder Methanol/Diisopropylethylamin zu dem Zeitpunkt abgebrochen, an dem die Massenanalyse das günstigste Verhältnis von Produkt zu teilgeschützten Edukten einerseits als auch von Produkt zu Nebenprodukten andererseits aufwies. Dieser optimale Zeitpunkt war nicht für alle Experimente gleich, sondern mußte bei jeder Umsetzung selbst unter identischen Bedingungen neu bestimmt werden und lag zwischen einer und drei Stunden. Auch die Zusammensetzung des Produktgemischs war Schwankungen unterworfen.

Da die Massenanalyse generell keine quantitativen Aussagen machen kann, sind die Messungen als Hinweis und nicht als gesicherte Tatsache zu bewerten. Es wurde jedoch deutlich, daß es bereits bei unvollständiger Entschützung zu Nebenreaktionen kam. Als wichtigstes Nebenprodukt trat eine Verbindung auf, deren Masse um 18 Da unter der Produktmasse lag. Offensichtlich wurde Wasser aus dem Peptid abgespalten. Eine Umsetzung mit der unphosphorylierten Sequenz **1.0** unter identischen Bedingungen als Vergleich zeigte in der Peptidsequenzierung nur die korrekte Sequenz, die aber ebenfalls eine um 18 Da zu geringe Masse aufwies. Diese Nebenreaktion ist bei Verwendung der Boc-Taktik bekannt. Bei der Abspaltung des Peptids vom Träger mit sehr starken Säuren wie TFMSA kann es zur Eliminierung von Wasser

aus Glutamin und Asparagin unter Bildung des entsprechenden Nitrils kommen. Bei dem hier durchgeführten Experiment ist wahrscheinlich das Asparagin an Position 8 von der Dehydratisierung betroffen. Die Rehydratisierung zum Amid mit alkalischer H_2O_2 -Lösung in Aceton [Liberek, 1961] wurde als nicht durchführbar bei einem Peptid eingeschätzt und auch im Hinblick auf die geringen Mengen an Nitril-Peptid nicht durchgeführt.

Um die Nebenreaktion zu unterdrücken, wurde in Variante 2 als Abspaltungsreagenz das Trimethylsilyl-Triflat eingesetzt [Kitas et al., 1990]. Außerdem wurden die Konzentration des Reagenzes sowie der Zusatz von Nukleophilen variiert (Tab. 4.2 und 7.4).

Tabelle 4.2: Abspaltung der Isopropylgruppen aus Peptid **1.3b**, Variante 2: TMS-OTf bei RT

TMS-OTf	Nukleophil	Zeit	Ergebnis
3 %		2 d	vollständig entschützt, teilweise Dehydratisierung (- H_2O)
5 %		0,5 h	unvollständig entschützt (uv), teilw. - H_2O
25 %	DMS, 10 %	1,5 h	uv, teilw. - H_2O
20 %	TA, 10 %	1 h	vollständig entschützt, teilw.- H_2O
20 %	TA, 10 % m-Cresol 10 %	3 h	vollständig entschützt, teilw. - H_2O

Dabei stellte sich heraus, daß die Verwendung dieses Reagenzes ebenfalls schon bei unvollständiger Abspaltung der Schutzgruppen zu Dehydratisierung führte. Der Zeitraum für eine „optimale“ Reaktion variierte wiederum innerhalb einer Methode und lag bei 45 bis 90 Minuten. Die Verwendung von Nukleophilen führte nicht zu einem einheitlichen Produkt oder zu kürzeren Reaktionszeiten, daher wurde bei weiteren Umsetzungen mit TMS-Triflat auf ihren Einsatz verzichtet.

Die ebenfalls getestete Entschützungsprozedur mit 1 M TMS-Br/1 M DMS in TFA (Variante 3) führte über einen Zeitraum von 30 Stunden neben unvollständiger Umsetzung zu Dehydratisierung und wurde nicht weiter angewendet.

Bei allen erwähnten Methoden mußte die Aufarbeitung unter anderen Bedingungen durchgeführt werden, als in der Literatur beschrieben ist. Nach Hydrolyse mit Methanol oder Wasser

erfolgte die Reinigung des Produkts direkt mit präp. HPLC. Wurde das Gemisch zuvor eingekonzentriert, so konnte das gewünschte Produkt nicht mehr nachgewiesen werden. Durch die Aufkonzentrierung des Abspaltungsreagenzes kam es zur weiteren Umsetzung zum vermuteten Nitril, die auch durch Neutralisierung der Hydrolysemischung mit DIEA nicht unterdrückt werden konnte. Wurde das Reaktionsgemisch in *tert*-Butylmethylether eingetropft, so ließ sich das ausgefallene Rohpeptid abzentrifugieren und anschließend mit präp. HPLC reinigen.

Als vierte Variante zur Schutzgruppenabspaltung wurde die Entschützung mit TMS-Iodid am Harz getestet [Fretz, 1996]. Dazu wurde das Harz mit dem vollständig geschützten Peptid **1.3b** in Acetonitril suspendiert und für 4 Stunden mit einem 20fachen Überschuß an TMS-I versetzt. Im Gegensatz zur Literatur wurde dabei die Abspaltung der Hauptmenge des Peptids vom Harz beobachtet, es konnten anschließend nur noch geringe Mengen durch Behandlung des Harzes mit Abspatlösung isoliert werden. Um eine vollständige Entschützung des bereits abgespaltenen Peptids zu gewährleisten, wurde das Rohpeptid ebenfalls mit Abspatlösung umgesetzt, aufgearbeitet und mit präp. HPLC gereinigt. Bei zwei durchgeführten Experimenten wurden unterschiedliche Ergebnisse beobachtet. Das gewünschte Peptid wurde in einem Fall in 37 % Ausbeute (bezogen auf die eingesetzte Harzmenge) erhalten, im anderen Fall fand wie auch bei den anderen Entschützungsverfahren eine Dehydratisierung statt. Die Verwendung eines geringeren Überschusses an TMS-I führte zu keiner Reaktion. Aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit bzw. der auftretenden Nebenreaktion, die methodenbedingt nicht verfolgt werden kann, ist diese Methode zur Abspaltung der Isopropylgruppen zumindest in dieser Sequenz nicht geeignet.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Abspaltung der Phosphonsäureschutzgruppen nur mit Problemen möglich war. Zum einen war für die vollständige Spaltung eine relativ lange Reaktionszeit nötig, zum anderen kam es schon nach kurzer Zeit zu Nebenreaktionen. Es konnten insgesamt 12,3 mg des vollständig entschützten Peptids **1.3** (9,0 µmol) isoliert werden. Bei den verwendeten Methoden (TFMSA/TFA oder TMS-OTf/TFA) mußte durch Reaktionskontrolle mit Hilfe der Massenspektrometrie der Zeitpunkt bestimmt werden, an dem die maximale Menge an gewünschtem Peptid vorlag, um dann die Reaktion abubrechen und das Peptid zu isolieren. Dadurch bedingt traten hohe Verluste auf. Die Verwendung von HPLC zur Reaktionskontrolle war aufgrund der langen Meßzeiten sowie der Störung durch die Nukleophilie nicht möglich.

4.3.3 Versuche zur Entschützung des Hydroxyphosphonat-Peptids **1.4a**

Da sich die Verwendung der Ethylester als Schutz für die Phosphonsäuregruppe aufgrund der vom Phosphat-Phosphonat bekannten Schwierigkeiten als nicht praktikabel erwiesen hatte, wurde das Hydroxyphosphonat als Isopropyl- oder *tert*-Butylester geschützt (s. Kap. 3.2).

Nach dem Einbau eines Diastereomers der Aminosäure **12c** in das Peptid **1.4** (s. Kap. 4.1.5) konnten die *tert*-Butylgruppen parallel zu den anderen Schutzgruppen mit TFA in 3 Stunden abgespalten werden, so daß kein zusätzlicher Schritt notwendig war. Auch die mit den *tert*-Butylgruppen zusammen verwendete MEM-Gruppe wurde unter den verwendeten Bedingungen vollständig abgespalten, was aufgrund der postulierten Stabilität der Gruppe [Kocienski, 1994] etwas überraschend war. Es konnten 4 mg des entschützten Peptids **1.4** isoliert werden (3,1 µmol).

Die Abspaltung der Isopropylgruppen aus dem Peptid **1.4a** erwies sich hier wie auch bei dem Phosphat-Phosphonat-Peptid **1.3b** als schwierig.

Die Reaktion unter Verwendung von TFMSA und Wasser als Nukleophil in TFA (Variante 1) wurde mit HPLC-Messungen verfolgt. Dabei traten zwei neue Peaks auf, die unter polaren Bedingungen als das Edukt eluiert wurden. Der zweite Peak konnte als einfach entschütztes Peptid identifiziert werden, durch verlängerte Reaktionszeit wurde die Umsetzung dieses Peptids komplettiert. Im ersten Peak lagen laut Massenanalyse mehrere Substanzen vor, von denen keine mit der gewünschten Masse des Produkts korrespondierte. Die Analysedaten ließen darauf schließen, daß das Peptid zwischen Hydroxyphosphonat und Asparagin gespalten wurde, da sowohl die Masse der Teilsequenz Asn⁸-Lys¹² als auch die des N-terminalen Peptids Ala¹-Ahp⁷ (-Wasser) vorhanden waren. Diese Spaltung kann durch eine Umlagerung verursacht worden sein, bei der die freie Hydroxylgruppe des „Homoserin“-Derivates die Amidbindung angreift und unter Eliminierung des C-terminalen Teilstücks mit der Carboxylgruppe einen fünfgliedrigen Lactonring bildet.

Bei der Verwendung von HBr 40 % in Eisessig (Variante 2) trat bereits nach 30 Minuten ein komplexes Produktgemisch auf, in dem das gewünschte Peptid laut Massenspektrometrie nicht vorhanden war. Neben dem kleinen Signal des Edukts wurden etliche Massen zwischen 600 und 900 Da erhalten, eine weitere Zuordnung war nicht möglich. Bei Reaktion über mehrere

Stunden trat eine weitere Masse auf, die dem C-terminalen Bruchstück entsprach, das nach Spaltung des Peptids durch die Essigsäure unter den Reaktionsbedingungen acetyliert wurde.

Wurde bei der dritten Variante zur Entschützung das TMS-Triflat in TFA verwendet, so zeigte sich wie auch schon bei TFMSA, daß eine der Isopropylgruppen abgespalten wurde, und daß es auch zur Peptidspaltung zwischen Position 7 (Ahpb) und 8 (Asn) kam. Dies ergab sich aus der Massenanalyse der Produktpeaks in der HPLC und wurde durch Aminosäureanalyse bestätigt, nach der die 5 C-terminalen Aminosäuren überproportional vorhanden waren (ca. 3:1).

Als vierte Variante wurde die Umsetzung mit TMS-Iodid auf dem Harz durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß auch bei dieser Sequenz das Peptid vom Harz abgespalten wurde. Zusätzlich fanden weitere Reaktionen statt, und es wurde ein komplexes Produktgemisch erhalten, in dem das gewünschte ungeschützte Peptid nicht vorhanden war.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß es bei Verwendung des Hydroxyphosphonats nicht gelang, die Isopropylgruppen in Peptid **1.4a** erfolgreich abzuspalten. Durch die stark sauren Reaktionsbedingungen wurde neben teilweiser Entschützung auch das Peptid gespalten, vermutlich begünstigt durch die Hydroxylgruppe. Es war auf diese Weise nicht möglich, das entschützte Peptid **1.4** nachzuweisen oder zu isolieren. Durch Verwendung des Aminosäurebausteins **12c** konnte das Problem umgangen werden, und das Peptid **1.4** wurde erhalten.

5 Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften der Peptide

Die in ihrer Synthese in Kapitel 4 beschriebenen Phosphat-Phosphonat- und Hydroxyphosphonat-Peptide wurden auf ihre Eigenschaft als Phosphatase-Inhibitoren getestet.

Eine weit verbreitete Methode bei der Bestimmung der inhibitorischen Wirkung einer Substanz ist die Umsetzung eines „Hilfssubstrats“, das sich oft strukturell von dem eigentlichen Substrat unterscheidet. Das „Hilfssubstrat“ wird von dem Enzym in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des potentiellen Inhibitors umgesetzt. Bei der Mehrzahl an Experimenten wird die Umsetzung zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb des quasi-linearen Bereichs (s. Kap. 2.4.2) abgebrochen, und es folgt die Bestimmung der Konzentration an gebildetem Produkt oder verbleibendem Edukt durch geeignete spektrometrische Methoden. Aus diesen Meßwerten erfolgt die Ermittlung der Aktivität des Enzyms sowie durch Korrelation der Aktivität mit der Konzentration der Substanz deren inhibitorische Wirkung. Diese Methode ist relativ einfach durchzuführen, sie besitzt jedoch auch zwei Nachteile. Der erste ist die Festlegung des Zeitpunktes zum Stoppen der Reaktion. Wird er spät gewählt (typischerweise nach mehreren Minuten), so findet die Umsetzung eventuell nicht mehr im quasi-linearen Bereich statt, und der gemessene Wert führt zu einer scheinbaren Aktivität, die niedriger als die tatsächliche Aktivität ist. Erfolgt der Abbruch früh (Zeitraum bis ca. 2 Minuten), so ist die Genauigkeit des Meßwertes durch systematische Unzulänglichkeiten nicht gegeben oder die Einhaltung des exakten Zeitpunktes schwierig. Sinnvoller ist eine fortlaufende Probennahme, die durch Interpolation die genaue Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ermöglicht. Das zweite Problem ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse von der Modellreaktion auf die realen Verhältnisse. Je ähnlicher sich das eigentliche Substrat und das Hilfssubstrat sind, desto besser kann von den gemessenen Werten auf die Wirkung des Inhibitors unter realen Bedingungen geschlossen werden; wenn möglich, sollte das eigentliche Substrat verwendet werden. Aus den erwähnten Gründen wurden die Inhibitionstests mit den entsprechenden Phosphopeptiden als Substrate durchgeführt, die Messungen erfolgten über einen längeren Zeitraum.

Bei den Tests wurden die Enzyme stark verdünnt eingesetzt, um die in Kapitel 2.4 aufgestellten Bedingungen zu erfüllen, daß die Substratkonzentration während der Umsetzung konstant und sehr viel größer als die Enzymkonzentration sein soll ($[S] = \text{konstant}$, $[S] \gg [E]$). Die genauen Konzentrationen sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

Bei allen Tests wurde das Protein BSA zugesetzt (2 mg/ml), um die Stabilität der Enzyme zu erhöhen und um deren Adsorption an Gefäßwänden u. ä. zu verringern bzw. zu verhindern.

5.1 Phosphat-Phosphonat-Peptide

Zunächst wurde die Dephosphorylierung des Phosphat-Phosphonat-Peptids **1.3** der ersten Sequenz als Substrat im Vergleich zur Umsetzung des Phosphopeptids **1.1** untersucht. In beiden Fällen wurde die alkalische Phosphatase eingesetzt. Dieses Enzym ist aus vielen Organismen isoliert worden und gut charakterisiert [Schomburg und Salzmann, 1991; Stinson und Chan, 1987]: es ist relativ unspezifisch und besitzt keine definierte Sequenzabhängigkeit der Aktivität. *In vivo* werden von dem Enzym in der Regel nichtpeptidische Phosphate dephosphoryliert.

Die Phosphatase sollte dementsprechend viele Substrate akzeptieren und mit ähnlichen Geschwindigkeiten umsetzen. Weitere Vorteile sind der relativ niedrige Preis, die leichte Verfügbarkeit sowie eine einfache Handhabung. Die Nachteile sind die oft geringe Aktivität, die auch durch die geringe Spezifität bedingt ist sowie das pH-Optimum im alkalischen Bereich. Letzteres kann bei Phosphaten unter Umständen zu β -Eliminierung führen und so die vom Enzym abgespaltene Menge an Phosphat zu höheren Werten hin verfälschen, so daß dieser Effekt gesondert quantifiziert werden müßte.

Testumsetzungen im pH-Bereich von 6,5 bis 8,5 ergaben, daß das Enzym mit dem Phosphopeptid **1.1** bei einem pH-Wert von 7,5 die höchste Aktivität aufwies.

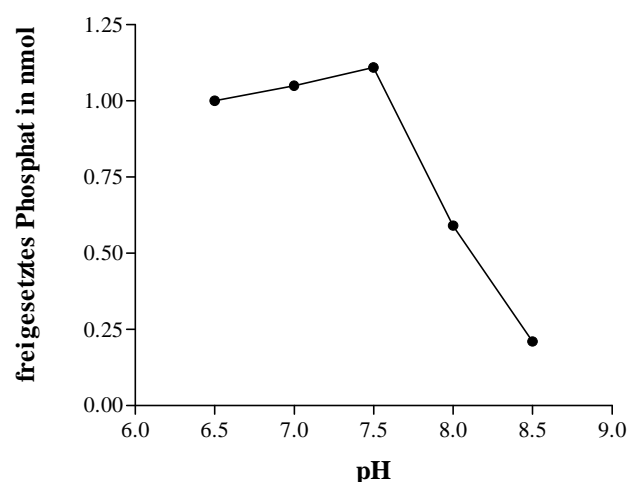


Abb. 5.1: Bestimmung des pH-Optimums der Dephosphorylierung des Peptids **1.1** durch alk. Phosphatase

Dieses Optimum liegt für eine alkalische Phosphatase relativ niedrig, die Beeinflussung des Meßergebnisses durch β -Eliminierung ist dadurch sehr gering.

Die Umsetzung wurde bei 30 °C durchgeführt, der verwendete Puffer setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 0,1 M Tris-Puffer, 1 mM MgCl_2 , 1 mM ZnCl_2 sowie 1 mg/ml BSA. Die Metallionen sind für eine hohe Aktivität des Enzyms wichtig. Während Zink für die Aktivität essentiell ist, führt Zugabe von Mg^{2+} zu einer Aktivitätssteigerung um einen Faktor bis zu 7 [Stinson und Chan, 1987]. Das Enzym wurde, der Bedingung $[\text{E}] \ll [\text{S}]$ gehorchend, in einer Konzentration von 100 nM ($= 10^{-5} \cdot [\text{S}]$) eingesetzt, das entsprach einer Enzymmenge von 0,85 μg bzw. 8,5 pmol bei einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Die Aktivität der Phosphatase wurde nach Angabe des Herstellers durch Umsetzung mit p-Nitrophenylphosphat (p-NPP) bestimmt und mit dem Sollwert verglichen. Das Enzym besaß zum Zeitpunkt der Durchführung der Dephosphorylierung noch 76 % der ursprünglichen Aktivität, das entsprach bei diesem Ansatz 83 mU (1,38 nkat), bezogen auf p-NPP bei pH 7,5.

Die Peptide wurden als Substrate in 6 Konzentrationen von 1 mM bis 20 mM eingesetzt. Die Grenzen ergaben sich zum einen aus der Löslichkeit, zum anderen aus der Empfindlichkeit des colorimetrischen Nachweissystems. Die Peptide waren nur mit Schwierigkeiten und unter Erwärmen zu 20 mM in dem Puffer löslich, eine höhere Konzentration konnte nicht erzielt werden. Bei Substratkonzentrationen unter 1 mM war die Produktbildung, d. h. die Freisetzung von Phosphat so gering, daß der Meßwert im linearen Bereich der Reaktion (bis max. 5 Minuten) nicht mehr verlässlich bestimmt werden konnte. Der Konzentrationsbereich von einer Zehnerpotenz ist als klein einzustufen, in der Regel sollten mindestens drei Zehnerpotenzen abgedeckt werden. Da dies nicht zu erreichen war, mußten die Experimente unter den gegebenen Bedingungen erfolgen. Die Verwendung von radioaktiv markiertem Phosphat als einer sensitiveren Methode war nicht möglich, die Gründe dafür sind weiter unten ausgeführt.

Zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion wurden vor Zugabe des Enzyms (Nullwert) sowie nach 1, 2, 3 und 5 Minuten Proben entnommen und zum Abstoppen der Reaktion mit dem gleichen Volumen HCl (1 M) versetzt. Die Säure inaktivierte das Enzym durch pH-Änderung, störte aber die Bestimmung des Phosphats nicht, da diese unter sauren Bedingungen durchgeführt wurde. Die Phosphatkonzentration der Stopplösung wurde durch Dreifachmessungen ermittelt.

Das freigesetzte Phosphat wurde mit der modifizierten Methode nach Lanzetta bestimmt: Das Phosphat bildete unter sauren Bedingungen mit Ammoniummolybdat und Malachitgrün einen Farbstoffkomplex, der durch das Detergenz Tween in Lösung gehalten wurde. Nach 1 Minute wurde Citrat zugesetzt, das den Meßwert stabilisierte. Die spektrometrische Messung des Farbkomplexes erfolgte mit einem Photometer bei 660 nm gegen den Nullwert. Durch eine Eichgerade, erhalten aus Messungen bekannter Konzentrationen an KH_2PO_4 , wurden die gemessenen Absorptionen in nmol Phosphat umgerechnet, dabei entsprachen 0,070 AU einer Phosphatmenge von 1,0 nmol [Lanzetta et al., 1979].

Zunächst wurden die Dephosphorylierung des Phosphopeptids **1.1** durchgeführt und die kinetischen Parameter bestimmt, um sie mit den Werten des Phosphat-Phosphonat-Peptids **1.3** zu vergleichen. Durch Auftragen der Menge an gebildetem Phosphat in Abhängigkeit von der Zeit wurde durch Interpolation die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bestimmt und diese wiederum gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Es ergab sich eine hyperbolische Kurve, aus der die Parameter ermittelt werden konnten: $K_M = 1,40 \text{ mM}$, $V_{\max} = 1,63 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

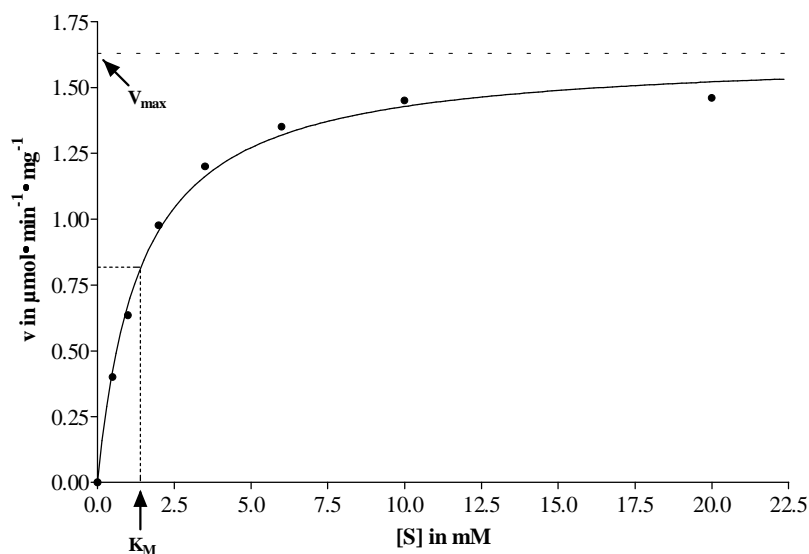


Abb. 5.2: Dephosphorylierung des Phosphopeptids **1.1** durch alk. Phosphatase, direkte Darstellung

Da aber diese Methode der Bestimmung prinzipiell etwas ungenau ist (s. Kap. 2.4.2.1), wurde die Darstellung nach Hanes (Abb. 5.3, s. Kap. 2.4.2.3) linearisiert und die Parameter durch lineare Regression berechnet: $K_M = 1,62 \text{ mM}$, $V_{\max} = 1,57 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Ein Vergleich beider Auswertungsverfahren ergab eine gute Übereinstimmung der kinetischen Parameter. Die Michaelis-Menten-Konstante K_M ist mit 1,62 mM relativ hoch, was auf eine schwache Bindung des Substrates zum Enzym deutet.

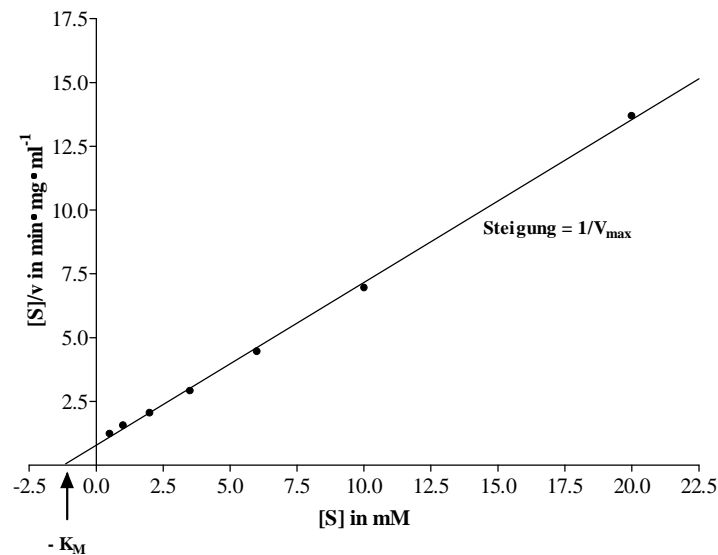


Abb. 5.3: Dephosphorylierung des Phosphopeptids **1.1** durch alk. Phosphatase, Darstellung nach Hanes

In einer zweiten Umsetzung wurde das Peptid **1.3** nach vollständiger Entschützung mit der alkalischen Phosphatase unter identischen Bedingungen dephosphoryliert. Der Nachweis, daß nur die Phosphatgruppe abgespalten wurde, konnte durch Massenspektrometrie erbracht werden; es traten nur Signale des Edukts sowie des gebildeten Hydroxyphosphonat-Derivates auf:

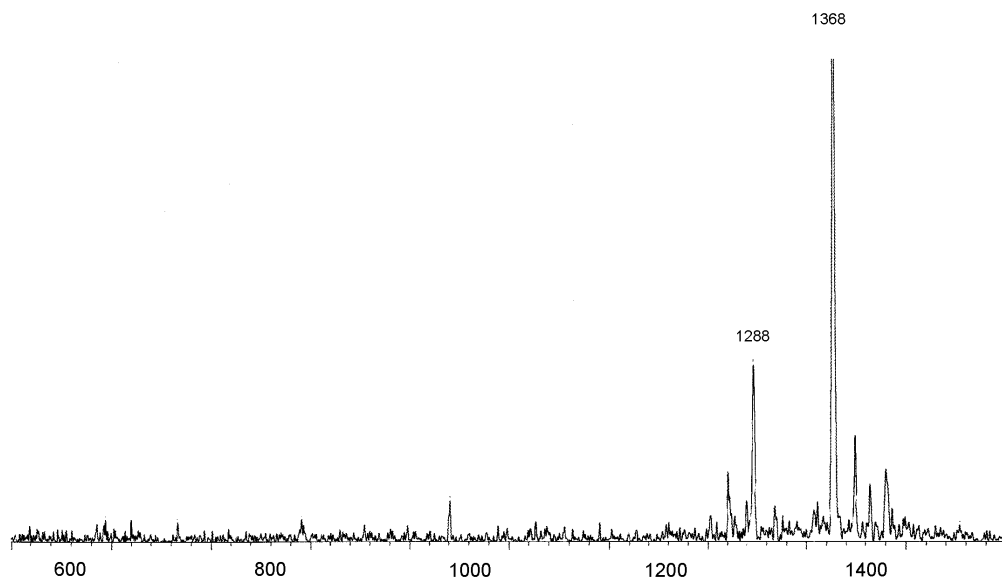


Abb. 5.4: MALDI-Massenspektrum der Dephosphorylierung des Phosphat-Phosphonat-Peptids **1.3** durch alk. Phosphatase nach 60 Minuten, Masse Phosphat-Phosphonat = 1368 Da, Masse Hydroxyphosphonat = 1288 Da

Die direkte Auswertung (Abb. 5.5) ergab, daß der Kurvenverlauf im Bereich geringer Substratkonzentrationen keine gute Übereinstimmung mit einer Hyperbel aufwies. Die Meßpunkte beschrieben vielmehr eine sigmoide Kurve.

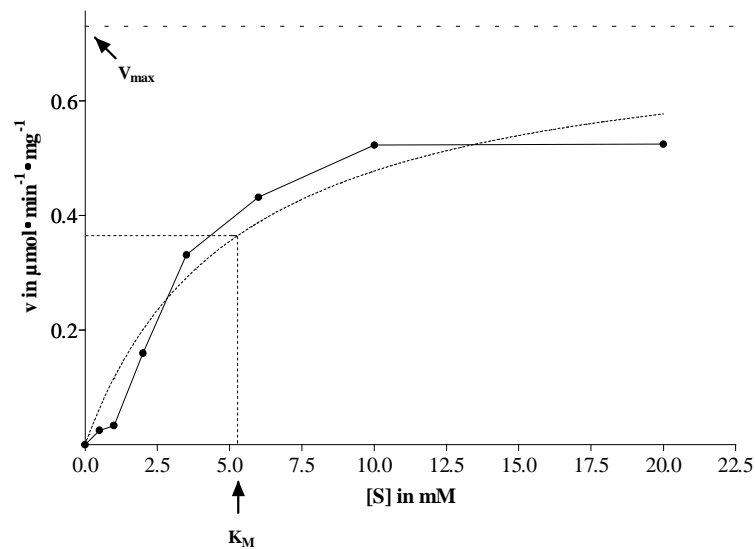


Abb. 5.5: Dephosphorylierung des Phosphat-Phosphonat-Peptids **1.1** durch alk. Phosphatase, direkte Darstellung

Auch die Auftragung nach Hanes zeigte eine Abweichung der Geraden von dem erwarteten Verlauf: bei höheren Substratkonzentrationen war die Kurve linear, bei niedrigeren Konzentrationen stieg die Kurve stark an.

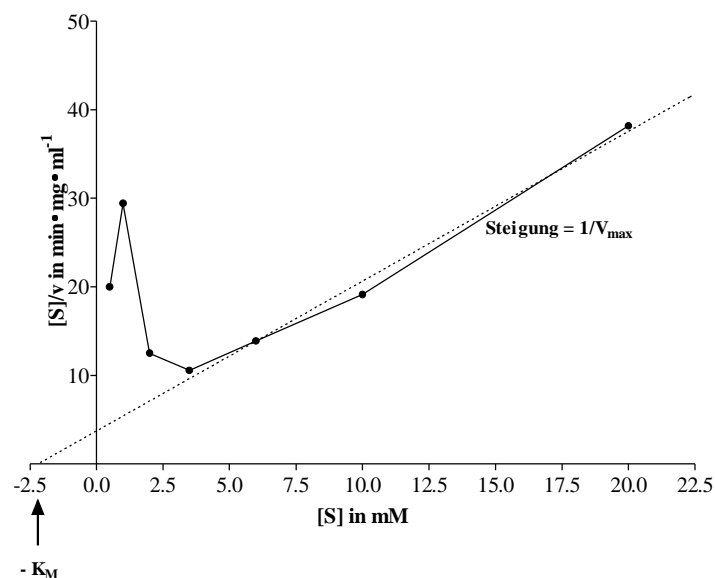


Abb. 5.6: Dephosphorylierung des Phosphat-Phosphonat-Peptids **1.1** durch alk. Phosphatase, Darstellung nach Hanes

Die kinetischen Parameter konnten wegen der Abweichungen vom theoretischen Verlauf nicht bestimmt werden. Abschätzungen anhand der Diagramme 5.5 bzw. 5.6 (gestrichelte Kurven) ergaben bei der direkten Methode 5,12 mM für K_M und $0,73 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ für V_{max} , bei der Auswertung nach Hanes 2,20 mM bzw. $0,59 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Damit lagen bei dem Phosphat-Phosphonat-Peptid K_M höher und V_{max} niedriger als bei dem Phosphopeptid.

Beide Auftragungen wiesen mit ihren Abweichungen charakteristisch auf das Vorliegen einer positiven Kooperativität hin, die durch zwei Modelle der Enzymstruktur erklärt werden kann. Das erste *slow transition model* postuliert folgendes: Es existiert nur ein aktives Zentrum, das aber in einer aktiven bzw. einer inaktiven Konformationen vorliegen kann [Ainslie et al., 1972]. Die Geschwindigkeit des Wechsels zwischen ihnen ist im Vergleich zu der der katalysierten Reaktion gering, die Bindung des Substrates erleichtert den Übergang von der „normalen“ inaktiven Form in die aktive. Bei niedrigen Substratkonzentrationen kann das Enzym nach Bindung des Substrates, Übergang in die aktive Form, Umsetzung zum Produkt sowie Ablösung des Produkts wieder in die inaktive Form übergehen, bevor ein weiteres Substratmolekül bindet. Ist diese erneute Bindung aber bei höheren Substratkonzentrationen schneller als die Inaktivierung, so werden im Laufe der Umsetzung immer mehr Enzymmoleküle in die aktive Form überführt und die zunächst geringe Rate der Produktbildung steigt deutlich an, bis sie in den Sättigungsbereich der aktiven Konformation übergeht. Das zweite Modell [Chappelet-Tordo et al., 1974] nimmt die Existenz von zwei Bindungsstellen (z. B. aktive Zentren, aber nicht nur diese) an, die sich gegenseitig beeinflussen (Abb. 5.7). Dabei sinkt bei Bindung des Substrates an das erste Zentrum (Schritt 1) die Affinität des zweiten ab, es erfolgt keine weitere Bindung von Substrat. Durch Umwandlung des gebundenen Substrates in das Produkt (2) erfolgt eine Steigerung der Affinität des zweiten Zentrums, und ein weiteres Substratmolekül wird gebunden (3). In diesem Zustand sind sowohl ein Molekül Substrat als auch ein Molekül Produkt am Enzym gebunden. Es stehen zwei Möglichkeiten zur Auswahl: Entweder erfolgt die Dissoziation des Produkts und der Enzym-Substrat-Komplex geht in den Zustand nach Schritt 1 zurück (4), oder das zweite Substrat wird in das Produkt umgewandelt (5). Anschließend erfolgt durch Dissoziation der Übergang (6) zum Komplex nach Schritt 2. Auch bei diesem Modell tritt eine verlangsamte Reaktionsgeschwindigkeit bei kleinen Substratkonzentrationen auf, bis ausreichend Enzymmoleküle den Schritt 2 durchlaufen haben. Daraufhin steigt die Rate bis in den Bereich der Enzymsättigung an.

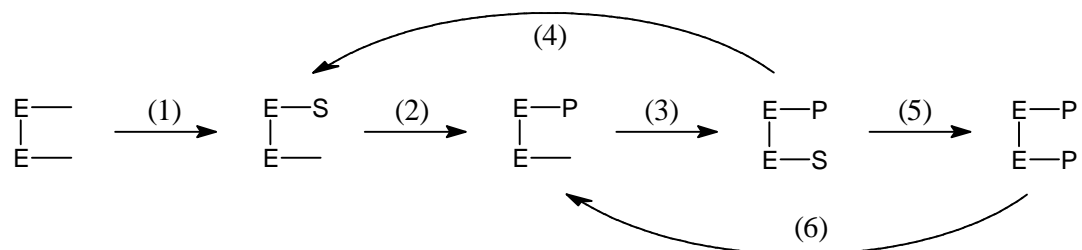


Abb. 5.7: Gegenseitige Beeinflussung zweier Bindungsstellen in einem Enzym

Bei der alkalischen Phosphatase kann von der Existenz einer zweiten Bindungsstelle, eventuell eines zweiten aktiven Zentrums, ausgegangen werden, obwohl deren Vorliegen nicht immer erkennbar ist [Fedde et al., 1988; Reid und Wilson, 1971; Torriani, 1968].

Ziel der Untersuchungen des Phosphat-Phosphonats war der Test auf inhibitorische Eigenschaften gegenüber Phosphatasen. Dazu sollte das Phosphat-Phosphonat-Peptid zusammen mit dem Phosphopeptid mit alkalischer Phosphatase umgesetzt werden. Es ist jedoch nicht möglich, aus der Gesamtmenge an freigesetztem Phosphat auf die Aktivität des Enzyms zu schließen. Aus beiden Peptiden werden Phosphatgruppen abgespalten, der Anteil aus dem jeweiligen Substrat/Inhibitor kann nicht bestimmt werden. Eine Differenzierung ist dann möglich, wenn ein Peptid radioaktiv mit ^{32}P markiert ist. Durch Messung des Gesamtphosphatgehalts sowie der Menge an radioaktivem Phosphat kann der jeweilige Anteil berechnet werden. Da keine enzymatische Methode zur Verfügung steht, um das markierte Phosphat in eines der Peptide zu inkorporieren, müßten beide aus den Aminosäuren synthetisiert werden. Das würde bedeuten, daß auf dem ganzen Syntheseweg mit radioaktivem Material gearbeitet werden müßte, was den Aufwand beträchtlich erhöhen würde. Die dazu notwendige Ausrüstung einschließlich der HPLC-Anlagen in einem speziellen Isotopenlabor war nicht vorhanden, so daß diese Möglichkeit nicht zur Verfügung stand.

Neben diesem prinzipiellen Problem trat noch eine weitere Schwierigkeit auf: die oben beobachtete Kooperativität. Es ist nicht auszuschließen, daß ein oder beide Peptide das Enzym in einer nicht vorhersagbaren Weise beeinflussen. Die Berechnungen der kinetischen Parameter kann so erschwert bzw. nicht durchführbar sein. Daher war eine Verwendung des Phosphat-Phosphonats in dieser Form nicht möglich.

Als Lösung der Probleme ist denkbar, daß das Phosphat-Phosphonat-Peptid zunächst mit einer Phosphatase zum Hydroxyphosphat umgesetzt wird, welches dann z. B. mit HPLC isoliert wird. Allerdings ist die gemessene Reaktionsrate des Peptids gering, es müßten große Mengen an Edukt bzw. Enzym eingesetzt und die Reaktion über einen langen Zeitraum durchgeführt werden, um nutzbare Mengen an Produkt zu erhalten. Auch die unvermeidlichen Verluste an Material sind ein großer Nachteil dieser Methode.

Als Zusammenfassung mußte festgestellt werden, daß das Phosphat-Phosphonat-Peptid entsprechend den Überlegungen und Erwartungen durch die alkalische Phosphatase in das Hydroxyphosphonat-Peptid überführt werden konnte. Eine direkte kinetische Untersuchung seiner Eigenschaft als Inhibitor war aus prinzipiellen und praktischen Gründen nicht möglich. Daher wurde das Hydroxyphosphonat-Peptid auf chemischem Weg direkt synthetisiert und auf seine inhibierende Wirkung getestet.

5.2 Hydroxyphosphonat-Peptid

Zunächst wurde aufgrund der geringen Empfindlichkeit der Umsetzung des ersten Peptids mit alkalischer Phosphatase eine zweite Sequenz [Agostinis et al., 1990] synthetisiert (s. Kap. 4.2). Sie ist zum einen ein Substrat der katalytischen Untereinheit der PKA. Es war demnach möglich, die Sequenz durch die Kinase enzymatisch mit radioaktivem Phosphat zu phosphorylieren. Zum anderen spaltet die Proteinphosphatase 2A das Phosphat mit ausreichender Geschwindigkeit ab. Dadurch sollte eine Methode vorhanden sein, die inhibierende Wirkung des Hydroxyphosphonats mit deutlich höherer Empfindlichkeit zu testen.

Die Proteinphosphatase 2A gehört der Familie der Serin-/Threoninphosphatasen an und weist eine höhere Aktivität gegenüber den Threoninphosphaten auf [Agostinis et al., 1987]. Sie wird durch Polykationen wie Polylysin oder Protamin stimuliert und aus diesem Grund auch als polycation stimulated (PCS) phosphatase bezeichnet. Neben der katalytischen Untereinheit ($M \sim 36$ kDa) existieren zwei regulatorische Untereinheiten ($M \sim 55$ kDa bzw. 60 kDa), die in den diversen Isoformen als Komplexe verschiedener Zusammensetzung auftreten. In der hier verwendeten Form PP 2A₂ liegt ein Komplex aus der katalytischen und der größeren regulatorischen Untereinheit vor ($M \sim 96$ kDa). Dieser Komplex besitzt gegenüber der zweiten Peptidsequenz eine mäßige Aktivität [Agostinis et al., 1990]. Es war jedoch keine andere Enzymform kommerziell erhältlich, die in anderen publizierten Arbeiten verwendeten Formen wurden durch aufwendige Prozeduren aus Skelettmuskeln isoliert.

Zunächst sollten zu Vergleichszwecken die kinetischen Parameter der Umsetzung des Phosphopeptids **2.1** mit der PP 2A₂ bestimmt werden. Die Bedingungen der Dephosphorylierung wurden entsprechend [Amick et al., 1992] gewählt: 30 °C, 50 mM Imidazol-Puffer, 2 mg/ml BSA und

10 % Glycerin zur Stabilisierung des Enzyms, 14 mM β -Mercaptoethanol und 10 μ g/ml Protaminsulfat zur Aktivitätssteigerung [Waelkens et al., 1984; Waelkens et al., 1987], 1 mM EDTA zum Komplexieren von zweiwertigen Kationen. Der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt. Das Substrat wurde als Mischung von radioaktiv markiertem „heißem“ Peptid (s. Kap. 4.2.1.3) und „kaltem“ Peptid (s. Kap. 4.2.1.1) in Konzentrationen von 2 mM sowie 20 μ M eingesetzt, das Enzym in 1,33 nM (entsprechend 7,7 ng bzw. 80 fmol). Zur Bestimmung des Umsatzes wurden nach 0, 1, 2, 3, 5, 10, 30 sowie 60 Minuten Proben entnommen, auf Phosphocellulosepapier getüpfelt und zum Abstoppen in 75 mM Phosphorsäure gegeben. Das basische Peptid blieb auf dem als Kationenaustauscher wirkenden Papier gebunden, das freigesetzte radioaktive Phosphat wurde mit der Phosphorsäure herausgewaschen. Die Bestimmung der auf dem Papier verbleibenden Radioaktivität erfolgte durch Scintillationsmessung. Dabei war festzustellen, daß keine Abnahme der Radioaktivität mit der Zeit zu erkennen war. Es wurde folglich kein Phosphat abgespalten, das Enzym war nicht aktiv.

Die zunächst aufgestellte Hypothese, daß die aus der HPLC-Reinigung als Gegenion vorliegende TFA (5 mol pro mol Peptid) das Enzym inhibierte, wurde bei Verwendung des durch Gelchromatographie gereinigten und in der Acetatform vorliegenden Peptids nicht bestätigt, das Enzym blieb inaktiv. Auch eine Erhöhung der Enzymmenge um den Faktor 10 brachte keine Änderung des Ergebnisses.

Um zu testen, ob die Nachweismethode fehlerhaft war, wurden zwei weitere Verfahren zur Phosphatbestimmung eingesetzt. Bei dem ersten Nachweis [Martin und Doty, 1949] wird gebildetes radioaktives Phosphat durch Überführung in einen Molybdatkomplex und dessen Extraktion mit Isobutanol/ Toluol (1:1 nach Volumen) in die organische Phase überführt. Die Bestimmung der Radioaktivität der beiden Phasen erfolgt ebenfalls durch Scintillationsmessung. Während radioaktiv markierte Phosphorsäure quantitativ in die organische Phase überführt und nachgewiesen wurde, konnten bei dem Dephosphorylierungsexperiment nur geringste Mengen an Radioaktivität gemessen werden, der größte Teil verblieb im Peptid gebunden in der wässrigen Phase.

Als zweite Methode wurde der Nachweis unter Verwendung von „kaltem“ Peptid und der colorimetrischen Bestimmung des Phosphats durchgeführt. Bei dem Verfahren konnte ebenfalls keine Freisetzung von Phosphat beobachtet werden.

Da wie oben erwähnt keine andere Präparation oder Isoform des Enzyms erhältlich war, konnte diese Methode somit nicht zur Anwendung kommen. Es mußte auf den weniger sensitiven Dephosphorylierungstest mit der colorimetrischen Phosphatbestimmung zurückgegriffen werden, dessen Durchführung analog dem oben geschilderten Verfahren stattfand.

Zur Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften des Hydroxyphosphonat-Peptids **1.5** wurde es in Konzentrationen von 0,3 mM, 0,6 mM sowie 1,0 mM zu der Substratlösung zugesetzt. Als Substrat diente das Phosphopeptid **1.1** in Konzentrationen von 1 mM bis 17 mM, die Konzentration an alkalischer Phosphatase betrug 100 nM (0,85 µg bzw. 8,5 pmol). Die Proben wurden vor Enzymzugabe sowie nach 1, 2, 3 und 5 Minuten entsprechend dem oben erläuterten Verfahren entnommen und vermessen.

Die Auftragung der Meßwerte im direkten Diagramm ergab vier Hyperbeln, die mit zunehmender Inhibitorkonzentration flacher verliefen:

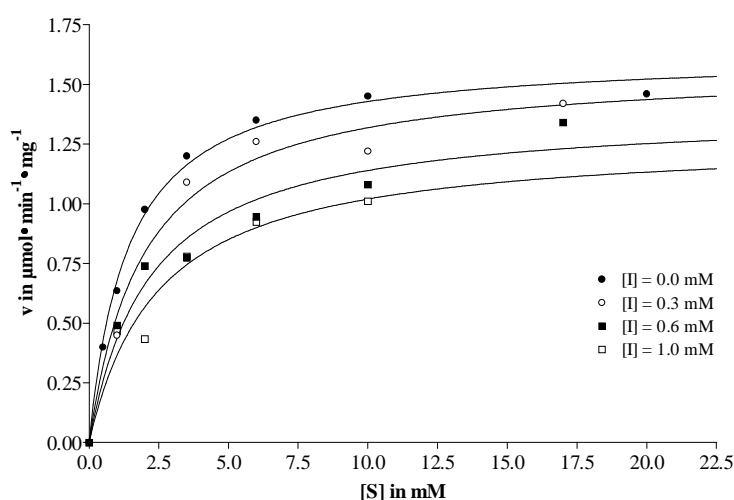


Abb. 5.8: Inhibition der Dephosphorylierung des Phosphopeptids **1.3** durch Hydroxyphosphonat-Peptid **1.5**, direkte Darstellung

Es war jedoch schwierig, aus der Auftragung die Art sowie die Stärke der Inhibierung zu ermitteln. Daher wurden die Kurven nach den in Kapitel 2.4 beschriebenen Verfahren linearisiert.

Im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 5.9) wiesen die Geraden (mit einer Ausnahme) einen gemeinsamen Schnittpunkt auf, der näherungsweise auf der y-Achse lag. Das deutete auf Vorliegen einer kompetitiven Inhibition des Enzyms hin.

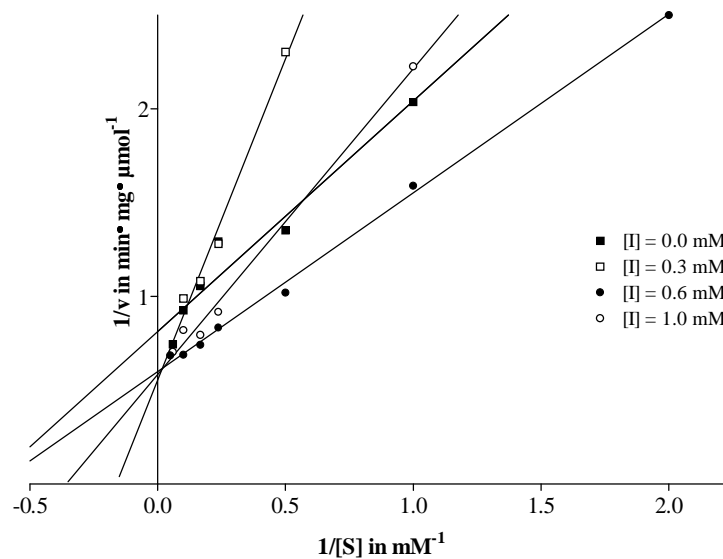


Abb. 5.9: Inhibition der Dephosphorylierung des Phosphopeptids **1.3** durch Hydroxyphosphonat-Peptid **1.5**, Darstellung nach Lineweaver-Burk

Durch Auftragung der Steigungen über den entsprechenden Inhibitorkonzentrationen im Sekundärdiagramm (Abb. 5.10) ließ sich die Inhibitionskonstante K_i zu 0,37 mM bestimmen.

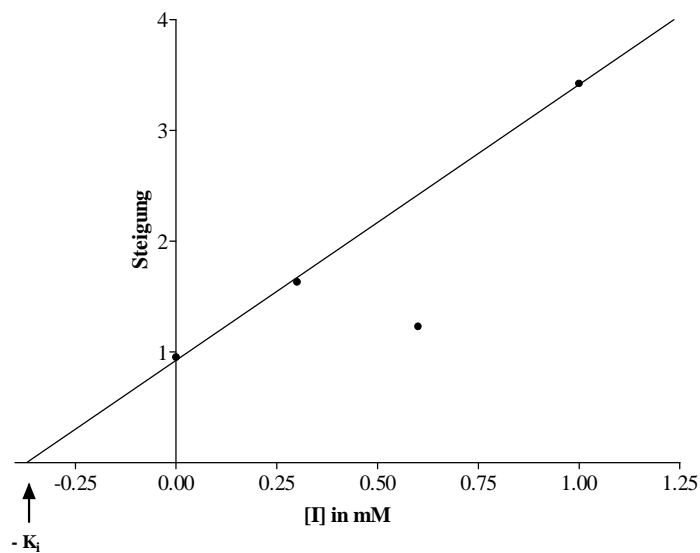


Abb. 5.10: Inhibition der Dephosphorylierung des Phosphopeptids **1.3** durch Hydroxyphosphonat-Peptid **1.5**, Sekundärdiagramm nach Lineweaver-Burk

Die Auftragung nach Hanes (Abb. 5.11) lieferte (erneut bis auf eine Ausnahme) näherungsweise parallele Geraden. Auch aus diesem Diagramm ließ sich auf das Vorliegen einer kompetitiven Hemmung schließen.

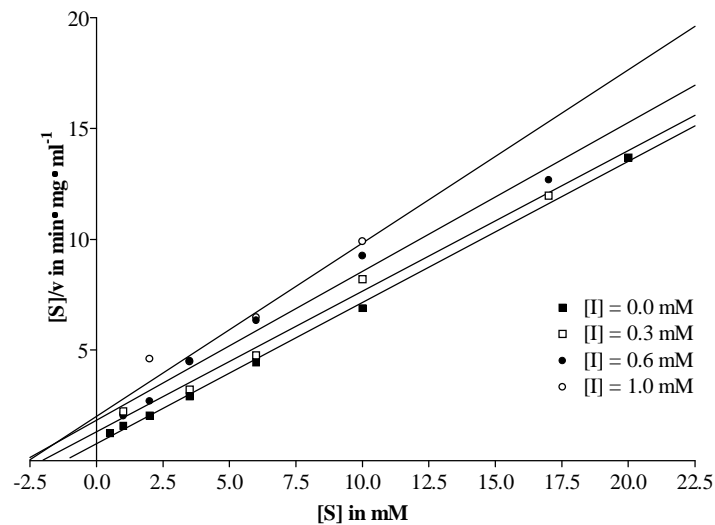


Abb. 5.11: Inhibition der Dephosphorylierung des Phosphopeptids **1.3** durch Hydroxyphosphonat-Peptid **1.5**, Darstellung nach Hanes

Im Sekundärdiagramm (Abb. 5.12) wurden die y-Achsenabschnitte über den Inhibitorkonzentrationen aufgetragen und lieferte für K_i den Wert 0,43 mM, der gut mit dem oben erhaltenen Wert übereinstimmte.

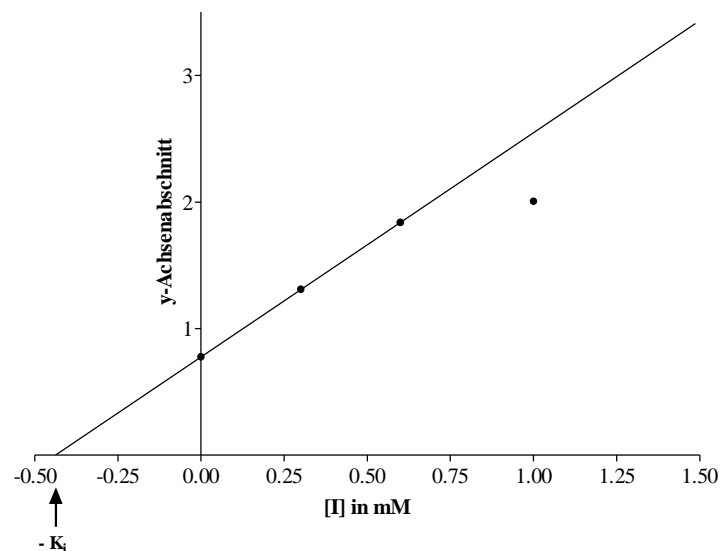


Abb. 5.12: Inhibition der Dephosphorylierung des Phosphopeptids **1.3** durch Hydroxyphosphonat-Peptid **1.5**, Sekundärdiagramm nach Hanes

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das Hydroxyphosphonat-Peptid als kompetitiver Inhibitor der alkalischen Phosphatase agiert, der Wert der inhibitorischen Konstante K_i liegt im mM-Bereich. Durch Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms wird die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes verhindert. Das bedeutet, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei gegebener Substratkonzentration abnimmt, die maximale Geschwindigkeit aber konstant bleibt. Dadurch ist eine höhere Substratkonzentration zum Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeit nötig, d. h. K_M nimmt zu. Diese aus den Experimenten erhaltene Art der Inhibition stimmte mit den theoretischen Überlegungen zur Wirkungsweise des Peptids überein und bestätigte diese. Das Verhältnis der Inhibitionskonstante K_i zur Michaelis-Konstante K_M (K_i/K_M) lag bei ca. 0,25. In der Literatur ist für die kompetitive Inhibierung der alkalischen Phosphatase mit Phosphat der Quotient mit 0,24 bzw. 0,3 angegeben [Fernley und Walker, 1967; Torriani, 1968]. Ein weiterer kompetitiver Inhibitor ist Arsenat, das einen K_i -Wert im μ M-Bereich aufweist [Fernley und Walker, 1967; Reid und Wilson, 1971].

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Es wurden zwei neue Phosphonatderivate des Phosphoserins synthetisiert, in Peptide eingebaut und auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber Phosphatasen getestet.

Die Synthese der Phosphat-Phosphonat-Aminosäure gelang unter Einsatz der Ethyl- oder Isopropylgruppen zum Schutz der Phosphor- und Phosphonsäuregruppen. Versuche zur Verwendung von *tert*-Butyl- oder Benzylgruppen schlugen bereits auf der Stufe der Umsetzung des Asparaginsäurechlorids mit den entsprechenden Phosphiten fehl. Die weitere Synthese verlief mit guten Ausbeuten; die Fmoc-Einführung im Falle des Ethylderivats wurde nicht optimiert, da die endgültige Entschützung des daraus resultierenden Peptids ohne Erfolg blieb.

Bei der Inkorporation der Derivate in die erste Peptidsequenz lag die Ausbeute an ethylgeschütztem Produkt höher als bei der Isopropylverbindung. Es wurde jedoch eine schlechte Kopplung beider Phosphat-Phosphonat-Aminosäuren beobachtet, die Umsetzung mit dem Isopropylderivat konnte durch Verwendung des Kopplungsreagenzes HATU leicht verbessert werden.

Die Synthese des regulären Phosphopeptids zeigte, daß die Einführung mit der Methode der globalen Phosphorylierung in hoher Ausbeute verlief. Als Nebenprodukt trat jedoch eine Umlagerung zum H-Phosphonat auf, das von dem gewünschten Produkt nicht vollständig getrennt werden konnte. Das Verfahren mit einem vorphosphorylierten Baustein lieferte bei guter Trennung eine schlechtere Ausbeute an Peptid; Versuche zur globalen Thiophosphorylierung schlugen fehl. Bei den Entschützungsexperimenten mußte im Falle der Ethylgruppen festgestellt werden, daß sie nicht von dem Peptid abgespalten werden konnten bzw. es zur Peptidzersetzung kam. Auch die Abspaltung der Isopropylgruppen gestaltete sich problematisch: So kam es bereits während der Abspaltung der Schutzgruppen zu einer Nebenreaktion, bei der ein Asparaginrest zum Nitril dehydratisiert wurde. Daher mußte für jede Umsetzung erneut mit Massenspektrometrie der „optimale“ Zeitpunkt des Abbruchs der Reaktion ermittelt werden.

Das Dephosphorylierungsexperiment des entschützten Peptids mit der alkalischen Phosphatase ergab, daß die Phosphatgruppe wie erwartet unter Bildung des Hydroxyphosphonats abgespalten

wurde, allerdings langsamer als bei dem regulären Phosphopeptid. Die Kinetik der Umsetzung zeigte eine positive Kooperativität, die nicht vermutet worden war und nicht erklärt werden konnte. Dies und die Tatsache, daß sich bei Inhibitionsexperimenten die Dephosphorylierungen zweier Peptide überlagern, ließen eine direkte Verwendung der Phosphat-Phosphonat-Struktur als nicht sinnvoll erscheinen.

Dieses Problem stellte sich bei der direkt synthetisierten Hydroxyphosphonat-Struktur nicht. Die Einführungen sowohl des Isopropyl- bzw. *tert*-Butyl-Hydroxyphosphonats als auch der Fmoc-Gruppe verliefen mit mäßigen bis guten Ausbeuten. Da die Fmoc-Derivate während der Aktivierung für die Peptidsynthese zum Lacton zyklisierten, mußte auch die Hydroxylgruppe geschützt werden. Im Falle des Isopropylderivates war die Verwendung der THP-Gruppe erfolgreich, im Falle des *tert*-Butylderivats wurden die THP- und die MEM-Gruppe getestet. Dabei konnte nur das MEM-geschützte Produkt erhalten werden, dieses allerdings mit guter Trennung der beiden Diastereomeren.

Die Peptidsynthese der ersten Sequenz mit der isopropyl- und THP-geschützten bzw. *tert*-butyl- und MEM-geschützten Aminosäure verlief allgemein in schlechter Ausbeute, verantwortlich dafür sind vermutlich sterische Einflüsse der Schutzgruppen. Während im ersten Derivat die Isopropylgruppe im Gegensatz zur THP-Gruppe bei der TFA-Behandlung im Molekül verblieb, wurden im zweiten die *tert*-Butyl- und die MEM-Gruppen bei der Entschützung des Peptids mit TFA abgespalten und das vollständig entschützte Peptid gebildet. Im Laufe der notwendigen Abspaltung des Isopropylgruppen kam es zur Zersetzung des Peptids, das nicht entschützt erhalten werden konnte.

Die Synthese der zweiten Sequenz konnte mit dem Isopropylderivat erfolgreich durchgeführt werden, ebenso die des regulären Phosphats und die enzymatische Markierung des Phosphopeptids mit radioaktivem Phosphat. Da aber zum einen bei Entschützungsexperimenten das Hydroxyphosphonat-Peptid zersetzt wurde, zum anderen die Umsetzung des radioaktiven Phosphats mit der Proteinphosphatase 2A scheiterte, wurde die zweite Sequenz nicht weiter verwendet.

In den Tests auf inhibitorische Wirkung des Hydroxyphosphonat-Peptids gegenüber der alkalischen Phosphatase wurde das Auftreten einer kompetitiven Hemmung des Enzyms durch das

Hydroxyphosphonat festgestellt, die inhibitorische Konstante K_i betrug ca. 0,4 mM. Dies bestätigt die Annahme, daß das Peptid als Inhibitor an die gleiche Stelle im Enzym bindet wie das Phosphopeptid als Substrat. Dessen kinetischen Konstanten K_M und V_{max} wurden zu 1,62 mM bzw. $1,57 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ bestimmt.

6.2 Ausblick

Da das Hydroxyphosphonat die erwartete kompetitive Hemmung gegenüber der alkalischen Phosphatase zeigte, sind als weiterführende Experimente zunächst die Untersuchung des Derivates mit Proteinphosphatasen sowie mit Kinasen durchzuführen, um die Allgemeingültigkeit der Inhibition zu testen. Falls dies gezeigt werden kann, ist ein Einsatz als Inhibitor zur Untersuchung von phosphatase- bzw. kinase-katalysierten Mechanismen denkbar. Als erstes Modell bietet sich die Dephosphorylierung der Myosin Light Chain durch die Proteinphosphatase 2C an. Des weiteren können Untersuchungen zur Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften durch modifizierte Peptidsequenzen durchgeführt werden. Außerdem wäre die Übertragung der Ergebnisse auf das Threonin-Analogon zu testen, da von diesem bisher keine Daten über inhibitorische Eigenschaften von Phosphonat-Derivaten vorliegen.

Neben dem Einsatz als Inhibitor für Kinasen und Phosphatasen sollten Derivate des Hydroxy-Phosphonats zur Affinitätsreinigung dieser Enzyme hergestellt und daraufhin getestet werden. Die in dieser Arbeit vorgestellte Sequenz kann als erster Ausgangspunkt eingesetzt werden, da das zur Immobilisierung notwendige Lysin als C-terminaler potentieller Anker bereits inkorporiert worden ist. Auch bei dieser Anwendung ist die PP 2C ein erstes Ziel, da über dieses Enzym bisher nur wenige Informationen vorliegen und noch kein selektiver Inhibitor identifiziert werden konnte.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Angaben

In diesem Kapitel wurde statt des Dezimalkommas der Punkt verwendet, da dieser sich bei der Angabe von NMR-Daten durchgesetzt hat. Aus Gründen der Einheitlichkeit wurde auch bei anderen Daten so verfahren.

Chemikalien: Lösungsmittel (außer DMF p.A.) wurden in HPLC-Qualität oder wasserfrei über Molsieb gelagert eingesetzt. TFA wurde über konz. Schwefelsäure destilliert, p-Toluolsulfonsäuremonohydrat zur Entfernung des Kristallwassers in Toluol gelöst (100 mg/50 ml), unter Rückfluß erhitzt, und das Wasser anschließend als Azeotrop mit Toluol abdestilliert. Dihydropyran wurde über Molsieb 4 Å, Z-Asp-OBzl und Natriumcarbonat im Hochvakuum getrocknet. Alle übrigen Chemikalien wurden nicht weiter gereinigt.

Enzyme: Die katalytische Untereinheit der PKA wurde freundlicherweise von W. Dostmann (University of Vermont, Burlington, USA) zur Verfügung gestellt, die alkalische Phosphatase (calf intestinal mucosa) wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen, die Proteinphosphatase 2A (Präparation PP 2A₂) von Calbiochem (Bad Soden), das radioaktive ATP (3 Ci/μmol) von Amersham Buchler (Braunschweig).

Die Aktivität der frischen alkalischen Phosphatase wurde wie folgt bestimmt: Der Puffer enthielt als Bestandteile: 0.1 M Glycin, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, der pH-Wert wurde mit HCl (1 M) auf 7.5 eingestellt. Das p-Nitrophenylphosphat wurde in Puffer zu einer Konzentration von 6 mM gelöst. Durch Zugabe von 1 μl einer Verdünnung der Enzymstammlösung 1:1000 (entspr. 3.96 ng Enzym) wurde die Umsetzung gestartet und die Bildung des gelben p-Nitrophenols wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 405 nm registriert. Durch lineare Regression wurde die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt und mit dem angegebenen Wert verglichen. Unter diesen Bedingungen lag die Aktivität des frischen Enzyms bei 48 U/μg, das entspricht 4.4 % des Sollwertes von 1091 U/μg, der allerdings für pH 10.4 angegeben ist.

Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms direkt vor Einsatz in Dephosphorylierungstests ergab unter identischen Bedingungen eine Aktivität von 36 U/μg (76 % der frischen Präparation).

Analytische HPLC: Es wurden C₈- und C₁₈-Säulen (250 x 4 mm, Macherey-Nagel, Düren) verwendet, die Fließmittel wurden mit bzw. ohne 0.1 % TFA in HPLC-Qualität (Acetonitril, Fließmittel B) oder in Millipore-Qualität (Wasser, Fließmittel A) eingesetzt und vor Gebrauch mit Helium entgast. Die eluierten Substanzen wurden bei 214 nm detektiert.

Folgende Gradienten wurden verwendet:

A1 Flußrate 1 ml/min linearer Gradient von 0 auf 100 % B in 50 min;

A2 Flußrate 1 ml/min, 0 % B für 10 min, in 2 min auf 10 %, in 20 min auf 40 %, in 5 min auf 60 %, in 2 min auf 100 %.

Präparative HPLC: Es wurden C₈-Säulen (250 mm x 1 Zoll, Macherey-Nagel, für Peptide) und C₁₈-Säulen (300 x 40 mm, Latek (Heidelberg), für Aminosäuren) verwendet, die Fließmittel wurden mit bzw. ohne 0.5 % TFA in HPLC-Qualität (Acetonitril und Methanol, Fließmittel B) oder in Millipore-Qualität (Wasser, Fließmittel A) eingesetzt und vor Gebrauch mit Helium entgast. Die eluierten Substanzen wurden bei 214 nm detektiert. Da die Peptide nach Reinigung TFA-Gegenionen enthalten (1 Molekül pro Aminogruppe), muß die Molekülmasse dementsprechend korrigiert werden (+ 97 Da pro TFA-Ion). Folgende Gradienten wurden verwendet:

P1 Flußrate 20 ml/min linearer Gradient von 50 auf 100 % B in 60 min;

P2 Flußrate 10 ml/min 0 % B für 10 min, linearer Gradient auf 40 % in 60 min.

Gelfiltration: Es wurde eine Agarose-Dextran-Säule (300 mm x 15 mm, Trennbereich 100 - 7000 Da, Pharmacia (Freiburg)) verwendet, als Fließmittel wurde 10%ige Essigsäure eingesetzt, die Flußrate betrug 1 ml/min. Die Fraktionen (1 ml) wurden eingeengt und die produktthaltigen Fraktionen vereinigt.

Säulenchromatographie: 200 g Kieselgel (Korngröße 40-60 µm, Merck, Darmstadt) wurden in dem entsprechenden Laufmittel suspendiert und in eine Säule (ø 60 mm) gefüllt, die Probe wurde in dem gleichen Laufmittel aufgetragen. Zur Elution dienten folgende Laufmittelgemische:

S1 EA/MeOH (8:2) 800 ml, EA/MeOH (1:1) 400 ml, MeOH 200 ml

S2 EA/cHex (1:4) 150 ml, EA/cHex (1:1) 150 ml, EA 300 ml, MeOH 300 ml

S3 alle mit 5 % AcOH: EA/cHex (4:6) 500 ml, EA/cHex (6:4) 500 ml, EA/cHex (7:3) 500 ml

S4 EA/cHex (1:4) 1000 ml, EA/cHex (1:1) 400 ml, EA 200 ml

Numerierung der Kerne bei NMR-Daten:

Die Numerierung wurde wie folgt durchgeführt: Es wurde an der α -Carboxylgruppe der Aminosäure begonnen, es folgten die Seitenkette, deren Schutzgruppen, die N-terminalen sowie die C-terminalen Schutzgruppen. Chemisch äquivalente Kerne erhielten gleiche Nummern, die Protonen wurden mit den gleichen Nummern wie die entsprechenden Kohlenstoffkerne bezeichnet.

^1H -NMR-Spektroskopie: Die Spektren wurden mit den Geräten WM-400 (400 MHz) bzw. AM-300 (300 MHz) der Fa. Bruker (Rheinstetten) aufgenommen, als Referenzsignal diente das (nicht vollständig deuterierte) Lösungsmittelsignal (CHCl_3 7.25 ppm, HDO 4.80 ppm). Die Verschiebungen sind in ppm angegeben, die Multiplizität der Signale wurde durch s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, m = Multipllett, br = breites Signal gekennzeichnet.

^{13}C -NMR-Spektroskopie: Die Spektren wurden mit den Geräten WM-400 (100 MHz) bzw. AM-300 (75 MHz) der Fa. Bruker protonen-breitbandentkoppelt aufgenommen, als Referenzsignal diente das Lösungsmittelsignal (CDCl_3 77.0 ppm). Die Verschiebungen sind in ppm angegeben, die Anzahl der am Kohlenstoff gebundenen Protonen wurde durch DEPT-Spektren bestimmt.

^{31}P -NMR-Spektroskopie: Die Spektren wurden mit den Geräten WM-400 (162 MHz) bzw. AM-300 (121 MHz) der Fa. Bruker protonen-entkoppelt aufgenommen, als externes Referenzsignal diente 85%ige Phosphorsäure. Die Verschiebungen sind in ppm angegeben. Die Multiplizität der Signale wurde durch s = Singulett, d = Duplett gekennzeichnet.

Massenspektroskopie: Die Massenspektren wurden mit einem Kratos Kompakt Maldi 3 Flugzeit-Massenspektrometer der Fa. Shimadzu (Duisburg) gemessen. Das Meßverfahren ist MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight) im Positiv-Ionen-Reflectron-Modus. Die Ionisierung erfolgte mit einem Laser bei 337 nm. Als Matrix dienten Sinapinsäure oder Dihydroxybenzoesäure, die jeweils in Wasser/Ethanol (1:1) gelöst aufgetragen wurden. Die Kalibrierung erfolgte mit vier Peptiden der Masse 660 Da, 771 Da, 1142 Da bzw. 1982 Da. Da bei dieser Ionisierungsmethode nur einfach positiv geladene Ionen (wie $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$) erzeugt werden, entspricht der gemessene m/z-Wert der Molekülmasse.

Festphasenpeptidsynthesen: Sämtliche Synthesen wurden nach der Fmoc/*t*Bu-Taktik durchgeführt. Die Beladung des Trägers (TentaGel S RAM, Fa. Rapp (Tübingen)) betrug 250 µmol/g Harz. Die Peptide wurden nach Abspaltung als C-terminale Amide erhalten.

Die Aminosäuren wurden im drei- oder vierfachen Überschuß in DMF unter Zugabe eines Äquivalentes *in situ*-Aktivator und zweier Äquivalente Base gekoppelt; wenn nicht anders erwähnt, wurden TBTU und N-Methylmorpholin eingesetzt. Von speziellen Aminosäuren wurden der zwei- oder dreifache Überschuß eingesetzt. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte mit 20 % Piperidin in DMF für 15 min, alle Waschschrte wurden mit DMF durchgeführt. Als Fmoc-Aminosäurederivate wurden verwendet: Arg(Pbf), Asn(Trt), Glu(*t*Bu), Lys(Boc), Ser(*t*Bu), Ser[P(O)(OH)(OBzl)], Ser(OH), Ala, Gly, Phe, Val. Das Cappen von freien Aminogruppen wurde mit Acetanhydrid/DIEA/DMF im Verhältnis 5:1:94 durchgeführt.

Die Abspaltung der Peptide vom Träger erfolgte mit TFA/Triisobutylsilan/Wasser im Verhältnis 95:3:2 (Reagenz „Silan“), das Harz wurde abfiltriert und mit Essigsäure gewaschen. Das Filtrat wurde eingengt und mit *tert*-Butyl-methylether versetzt. Das Rohpeptid wurde abzentrifugiert und mit präp. HPLC (C₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) gereinigt. Die Fraktionen wurden eingengt und aus Wasser lyophilisiert.

Die automatischen (Teil-)Synthesen wurden mit den Geräten 9050 der Fa. Milligene (Wiesbaden, Einzelsequenzen) bzw. AMS 422 der Fa. Abimed (Langenfeld, Einzel- und Mehrfachsequenzen) nach den folgenden Protokollen durchgeführt:

Milligen (Durchflußverfahren): Aminosäure und TBTU fest vorgelegt, während der Synthese zu 0.33 M in DMF gelöst; N-Methylmorpholin 0.6 M in DMF

Entschützung	7 min
Waschen	12 min
Kopplung	Zeit wie in Kapitel 4 bzw. 7 angegeben, zyklisierende Lösung
Waschen	8 min

Abimed (statisches Batchverfahren): Aminosäure-Derivate 0.7 M in DMF (Phe in N-Methylpyrrolidon), TBTU 0.6 M in DMF, N-Methylmorpholin 4 M in DMF

Entschützung	2 x 7.5 min
Waschen	6 x 1 min
Kopplung	Zeit wie in Kapitel 4 bzw. 7 angegeben
Waschen	6 x 1 min

Bei beiden Geräten wurden die Peptide nach der (Teil-) Synthese mit freiem N-Terminus erhalten

Fmoc-Bestimmung (Fmoc-Test):

Das Harz wurde mit Abspalllösung für 15 Minuten behandelt und abfiltriert. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen wurden für 1 Stunde stengelassen, damit die Bildung des Fmoc-Piperidin-Addukts vollständig abgeschlossen werden konnte. Anschließend wurde zur Trockene eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in einem definierten Volumen Methanol gelöst, die Absorption nach entsprechender Verdünnung bei 289 nm gemessen und mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von $5570 \cdot (1000 \text{ cm}^2 \text{mol}^{-1})$ die Menge an Dibenzofulven-Piperidin-Addukt berechnet.

Bromphenolblau-Bestimmung (BPB-Test) von freien Aminogruppen:

Das Harz wurde mit BPB-Lösung (1 bzw. 10 mg/ml DMF, entspricht 1.5 bzw. 15 $\mu\text{mol/ml}$) im Überschuß versetzt und der nicht gebundene Anteil an BPB mit tech. Ethanol gut herausgewaschen. Mit DIEA (1 % in DMF) wurde das BPB eluiert und mit Elutionslösung auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Nach entsprechender Verdünnung wurde die Absorption bei 605 nm gemessen und die Menge an Bromphenolblau mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von $106590 \cdot (1000 \text{ cm}^2 \text{mol}^{-1})$ berechnet.

Phosphatbestimmung durch colorimetrischen Test: Die Bestimmungen wurden nach Lanzetta durchgeführt [Lanzetta et al., 1979], das Detergenz Sterox wurde durch Tween 20 ersetzt [Chalvardjian und Rudnicki, 1970]. Folgende Lösungen wurden verwendet:

Lösung A:	Malachitgrün	0.045 % in H_2O
Lösung B:	Ammoniummolybdat	4.2 % in 4 N HCl
Lösung C:	Tween 20	1.5 % in H_2O

Lösung D: 3 Teile Lösung A und 1 Teil Lösung B (nach Volumen) wurden gemischt und für mind. 30 min geschüttelt.

Reagenz 1: Lösung D wurde filtriert und mit Lösung C versetzt: 100 µl C pro 5 ml D

Reagenz 2: Citronensäure · 3 Na · H₂O 34 % in H₂O

Reagenz 1 war für ca. 1 Woche bei 4 °C haltbar, Reagenz B war stabil und wurde bei RT aufbewahrt, um ein Auskristallisieren zu verhindern.

Durchführung: 10 µl Probe wurden mit 40 µl H₂O aufgefüllt und mit 0.8 ml Reagenz 1 versetzt. Nach 60 Sekunden wurden 100 µl Reagenz 2 zugesetzt und gut durchmischt. Die Lösung konnte sofort bei 660 nm im Photometer vermessen werden, zur Stabilisierung des Meßwertes wurde 20 Minuten gewartet. Zur Messung wurden Einmalküvetten aus Polystyrol verwendet, die Farbreaktion wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Aus einer Eichreihe mit KH₂PO₄ wurde die spezifische Absorption zu 0.070 AU/nmol anorganisches Phosphat bestimmt.

7.2 Darstellung der Phosphat-Phosphonat-Derivate

7.2.1 Darstellung von N-(Benzyloxycarbonyl)-L-asparaginsäure-4-chlorid-1-benzylester (Z-Asp(Cl)-OBzl, 1)

2.5 g N-(Benzyloxycarbonyl)-L-asparaginsäure-1-benzylester (7 mmol) wurden in 15 ml CH₂Cl₂ gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 3.5 ml Oxalylchlorid (2 M in CH₂Cl₂, 7 mmol) versetzt. Als Katalysator wurde 1 Tropfen DMF zugegeben, und es wurde bis zur Beendigung der Gasentwicklung gerührt, wobei das Kühlbad kurz nach Beginn der Reaktion entfernt wurde. Die Lösung wurde im Vakuum ohne Erwärmen eingeeengt, und der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 2.627 g des gelblichen Feststoffs erhalten (6.99 mmol, 100 % Ausbeute).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.3-7.4 (m, 10 H, H_{ar}), 5.67 (d, 1 H, NH), 5.19 (s, 2 H, H-6), 5.11 (s, 2 H, H-11), 4.65 (m, 1 H, H-2), 3.53 (m, 2 H, H-3).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 172.0 (C, C-4), 169.2 (C, C-1), 155.8 (C, C-5), 135.8 (C, C-7), 134.7 (C, C-12), 128-129 (CH, CH_{ar}), 68.2 (CH₂, C-6), 67.4 (CH₂, C-11), 50.8 (CH, C-2), 48.8 (CH₂, C-3).

7.2.2 Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-diethylphosphato-4-diethylphosphono-buttersäure-benzylester (Z-Appb(Et₄)-OBzl, **2a**)

720 mg Natriumhydrid (60 % in Mineralöl, 18.0 mmol) wurden in 15 ml THF suspendiert und auf 0 °C gekühlt. 2.32 ml Diethylphosphit (18.0 mmol) wurden zugegeben, und es wurde bis zur Beendigung der Gasentwicklung gerührt. Eventuelle feste Rückstände wurden abzentrifugiert. 5.3 g Säurechlorid **1** (14.1 mmol) wurden in 30 ml THF gelöst und portionsweise mit der Phosphitlösung versetzt. Bei beginnender Rotfärbung des Reaktionsgemischs wurde die Zugabe sofort beendet. Nach 90 Minuten Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit 50 ml Phosphatpuffer (1 M, pH 7.0) versetzt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mit präp. HPLC (C₁₈-Säule, 50 % Acetonitril) gereinigt. Neben 1.26 g Produkt **2a** (2.05 mmol, 13 % Ausbeute) konnten 0.83 g Z-Asp(OH)-OBzl (2.32 mmol, 29 % Ausbeute) wiedergewonnen werden.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.3 (m, 10 H, H_{ar}), 6.20 (d, 1 H, NH), 5.18 (s, 2 H, H-10), 5.11 (s, 2 H, H-15), 4.74 (m, 1 H, H-2), 4.67 (m, 1 H, H-4), 4.1 (m, 8 H, H-5, H-7), 2.43 (m, 2 H, H-3), 1.3 (m, 12 H, H-6, H-8).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): 171.1 (C, C-1), 156.1 (C, C-9), 136.4 (C, C-11), 135.4 (C, C-16), 128-129 (CH, CH_{ar}), 69.5 (CH, d, ¹J(C,P) = 172 Hz, C-4), 67.3 (CH₂, C-5), 66.9 (CH₂, C-7), 64.5 (CH₂, C-10), 63.3 (CH₂, C-15), 51.9 (CH, C-2), 33.4 (CH₂, C-3), 16.4 (CH₃, C-6), 16.0 (CH₃, C-8).

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): 20.2 (d, ¹J(P,P) = 22 Hz, Phosphonat), 8.5 (s, Edukt), 0.3 (d, ¹J(P,P) = 22 Hz, Phosphat).

7.2.3 Darstellung von (2L)-2-Amino-4-diethylphosphato-4-diethylphosphono-buttersäure (Appb(Et₄), **3a**)

150 mg der geschützten Aminosäure **2a** (0.244 mmol) wurden in 10 ml Essigsäure gelöst und mit 100 mg Palladiumhydroxid auf Kohle (entspr. 20 mg Pd) versetzt. Die Luft wurde durch Anlegen von Wasserstrahlvakuum und anschließendes Belüften mit Wasserstoff aus der Apparatur entfernt. Es wurde mit mäßigem Strom Wasserstoff durch die Flüssigkeit geleitet.

Nach 3 Stunden wurde der Katalysator abfiltriert und mit Essigsäure gewaschen. Das Filtrat wurde lyophilisiert und ergab 90 mg Produkt **3a** (0.23 mmol, 94 % Ausbeute).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.7 (br. s), 5.14 (m, 1 H, H-2), 4.13 (m, 8 H, H-5, H-7), 3.85 (m, 1 H, H-4), 2.42 (dm, 2 H, H-3), 1.27 (m, 12 H, H-6, H-8).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 172.7 (C, C-1), 70.3 (CH, d, ¹J(C,P) = 169 Hz, C-4), 64.6 (CH₂, C-5), 63.4 (CH₂, C-7), 50.8 (CH, C-2), 32.7 (CH₂, C-3), 16.3 (CH₃, C-6), 15.9 (CH₃, C-8).

³¹P-NMR (CDCl₃, 121 MHz): 20.7 (d, ¹J(P,P) = 22 Hz, Phosphonat, Diastereomer I), 20.3 (d, ¹J(P,P) = 20 Hz, Phosphonat, Diastereomer II), 0.6 (d, ¹J(P,P) = 20 Hz, Phosphat, Diastereomer II), -0.6 (d, ¹J(P,P) = 22 Hz, Phosphonat, Diastereomer I).

7.2.4 Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-diethylphosphato-4-diethylphosphono-buttersäure (Fmoc-Appb(Et₄)-OH, **4a**)

0.59 g der Aminosäure **3a** (1.5 mmol) wurden in 15 ml ges. NaHCO₃-Lösung gelöst, mit 15 ml Dioxan versetzt und auf 0 °C gekühlt. 3.5 g Fmoc-OSuc (10.4 mmol) gelöst in 25 ml Dioxan wurden in Portionen zugesetzt und es wurde über Nacht gerührt. Das Gemisch wurde mit Citronensäurelösung (10 % in Wasser) angesäuert, wobei das Produkt ausfiel. Es wurde mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, anschließend mit MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt (4.12 g) wurde mit Säulenchromatographie (Gradient S1) und präp. HPLC (C₁₈-Säule, 35 % Acetonitril mit 0.5 % TFA, Flußrate 20 ml/min) gereinigt. Es wurde das Produkt **4a** in beide Diastereomere getrennt erhalten: 57 mg (0.093 mmol, 6 % Ausbeute) bzw. 280 mg (0.46 mmol, 30 % Ausbeute).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.73 (d, 2 H, H-16), 7.60 (dd, 2 H, H-13), 7.38 (dd, 2 H, H-15), 7.29 (dd, 2 H, H-14), 6.20 (d, 1 H, NH), 4.92 (m, 1 H, H-4), 4.60 (m, 1 H, H-2), 4.34 (m, 2 H, H-10), 4.20 (m, 9 H, H-9, H-5, H-7), 2.42 (m, 2 H, H-3), 1.3 (m, 12 H, H-6, H-8).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): 172.4 (C, C-1), 155.7 (C, C-9), 143.8 (C, C-12), 141.3 (C, C-17), 127.7 (CH_{ar}, C-15), 127.1 (CH_{ar}, C-14), 125.3 (CH_{ar}, C-13), 120.0 (CH_{ar}, C-16), 70.0 (CH, d, ¹J(C,P) = 172 Hz, C-4), 67.2 (CH₂, C-10), 65.2 (CH₂, C-7), 63.7 (CH₂, C-5), 50.5 (CH, C-11), 47.1 (CH, C-2), 34.9 (CH₂, C-3), 16.4 (CH₃, C-6), 16.0 (CH₃, C-8).

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): 20.3 (d, ¹J(P,P) = 20 Hz, Phosphonat, Diastereomer I), 19.9 (d,

$^1\text{J}(\text{P},\text{P}) = 23 \text{ Hz}$, Phosphonat, Diastereomer II), 0.1 (d, $^1\text{J}(\text{P},\text{P}) = 23 \text{ Hz}$, Phosphat, Diastereomer II), -0.2 (d, $^1\text{J}(\text{P},\text{P}) = 20 \text{ Hz}$, Phosphat, Diastereomer I).

7.2.5 Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-diisopropylphosphato-4-diisopropylphosphono-buttersäure-benzylester (Z-Appb(*i*Pr₄)-OBzl, **2b**)

0.6 g Natriumhydrid (15 mmol) wurden in 30 ml THF suspendiert und mit 2.5 ml Diisopropylphosphit (15 mmol) versetzt. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde die Lösung von Rückständen abdekantiert. 1.128 g Säurechlorid **1** (2.9 mmol) wurden in 30 ml THF gelöst und portionsweise mit der Phospitsalzlösung versetzt. Bei beginnender Rotfärbung des Reaktionsgemischs wurde die Zugabe sofort beendet (ca. 6 ml). Nach 30 Minuten Rühren wurde der Ansatz mit 30 ml Phosphatpuffer (1 M, pH 7.0) versetzt, und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mit Säulenchromatographie (Gradient S2) und präp. HPLC (C_{18} -Säule, Gradient P1) gereinigt. Die Ausbeute an Produkt **2b** betrug 0.549 g (0.82 mmol, 28 % Ausbeute), 0.383 g des Edukts konnten wiedergewonnen werden (1.07 mmol, 37 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): 7.33 (m, 10 H, H_{ar}), 6.34 (d, 1 H, NH), 5.18 (s, 2 H, H-10), 5.09 (s, 2 H, H-15), 4.67 (m, 6 H, H-2, H-4, H-5, H-7), 2.43 (m, 2 H, H-3), 1.32 (m, 24 H, H-6, H-8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): 171.1 (C, C-1), 156.1 (C, C-9), 136.3 (C, C-11), 135.3 (C, C-16), 128-129 (CH, CH_{ar}), 73.2 (CH, C-7), 72.1 (CH, C-5), 69.7 (CH, d, $^1\text{J}(\text{C},\text{P}) = 174 \text{ Hz}$, C-4), 67.0 (CH₂, C-10), 66.6 (CH₂, C-15), 51.2 (CH, C-2), 33.3 (CH₂, C-3), 23.3-23.7 (CH₃, C-6, C-8).

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 121 MHz): 18.4 (d, $^1\text{J}(\text{P},\text{P}) = 29 \text{ Hz}$, Phosphonat), -1.2 (d, $^1\text{J}(\text{P},\text{P}) = 29 \text{ Hz}$, Phosphat).

7.2.6 Darstellung von (2L)-2-Amino-4-diisopropylphosphato-4-diisopropylphosphono-buttersäure (Appb(*i*Pr₄), **3b**)

240 mg der geschützten Aminosäure **2b** (0.358 mmol) wurden in 15 ml Essigsäure gelöst und mit 200 mg Palladiumhydroxid auf Kohle (entspr. 40 mg Pd) versetzt. Die Luft wurde durch

Anlegen von Wasserstrahlvakuum und anschließendes Belüften mit Wasserstoff aus der Apparatur entfernt. Es wurde mit mäßigem Strom Wasserstoff durch die Flüssigkeit geleitet. Nach 45 Minuten wurde der Katalysator abfiltriert und mit Essigsäure gewaschen. Das Filtrat wurde lyophilisiert und ergab 150 mg Produkt **3b** (0.336 mmol, 94 % Ausbeute).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 4.93 (m, 1 H, H-2), 4.68 (m, 4 H, H-5, H-7), 4.10 (m, 1 H, H-4), 2.50 (br. d, 2 H, H-3), 1.31 (m, 24 H, H-6, H-8).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 172.1 (C, C-1), 70.2 (CH, d, ¹J(C,P) = 169 Hz, C-4), 74.1 (CH₂, C-5), 72.8 (CH₂, C-7), 50.3 (CH, C-2), 32.1 (CH₂, C-3), 23-24 (CH₃, C-6, C-8).

³¹P-NMR (CDCl₃, 121 MHz): 18.1 (d, ¹J(P,P) = 25 Hz, Phosphonat, Diastereomer I), 17.6 (d, ¹J(P,P) = 25 Hz, Phosphonat, Diastereomer II), -1.2 (d, ¹J(P,P) = 25 Hz, Phosphat, Diastereomer II), -2.4 (d, ¹J(P,P) = 22 Hz, Phosphat, Diastereomer I).

7.2.7 Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-diisopropylphosphato-4-diisopropylphosphono-buttersäure (Fmoc-Appb(*i*Pr₄)-OH, **4b**)

In Vorversuchen (Tab. 7.1) wurden 15 mg (34 μmol) der Aminosäure **3b** in 3 ml des Lösungsmittels gelöst und mit einem Überschuß an Fmoc-Reagenz sowie a) 12 μl DIEA (38 μmol, Eintrag 2-5) bzw. b) 36 μl DIEA (114 μmol) und 8 μl TMS-Cl (76 μmol, Eintrag 6) versetzt. Die Umsetzung wurde mit HPLC verfolgt, und die Reaktion wie angegeben aufgearbeitet.

Tabelle 7.1: Einführung der Fmoc-Gruppe in Aminosäure **3b**

Lösungsmittel	Fmoc-Derivat	Aufarbeitung	Ergebnis
NaHCO ₃ /Dioxan	Fmoc-OSuc	Extraktion	22 % Ausbeute
CH ₂ Cl ₂	Fmoc-OSuc	einengen, HPLC	25 % Ausbeute
EA	Fmoc-Cl	einengen, HPLC	16 % Ausbeute
CH ₂ Cl ₂	Fmoc-Cl	einengen, HPLC	59 % Ausbeute
Acetonitril/MeOH	Fmoc-OSuc	einengen, HPLC	60 % Ausbeute
CH ₂ Cl ₂	Fmoc-Cl	Extraktion	67 % Ausbeute, n. reproduzierbar

Zur optimierten Umsetzung wurden 191 mg der Aminosäure **3b** (0.43 mmol) in 8 ml Methanol und 8 ml Acetonitril gelöst und mit 150 μ l DIEA (0.86 mmol) versetzt. Fmoc-OSuc wurde portionsweise zugesetzt (insgesamt 408 mg, 1.2 mmol), bis die Reaktion laut DC vollständig war (ca. 12 h). Die Lösung wurde eingeeengt und das Rohprodukt (830 mg) mit Säulenchromatographie (Gradient S3) und präp. HPLC (C_{18} -Säule, Gradient P1, mit 0.5 % TFA) gereinigt. Es konnten 173 mg Produkt **4b** (0.26 mmol, 60 % Ausbeute) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): 7.74 (d, 2 H, H-16), 7.59 (m, 2 H, H-13), 7.39 (dd, 2 H, H-15), 7.29 (dd, 2 H, H-14), 6.10 (d, 1 H, NH), 4.73 (dm, 6 H, H-2, H-4, H-5, H-7), 4.38 (d, 2 H, H-10), 4.21 (t, 1 H, H-11), 2.45 (m, 2 H, H-3), 1.34 (m, 24 H, H-6, H-8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): 174.4 (C, C-1), 156.6 (C, C-9), 143.7 (C, C-12), 141.3 (C, C-17), 127.8 (CH_{ar} , C-15), 127.1 (CH_{ar} , C-14), 125.1 (CH_{ar} , C-13), 120.0 (CH_{ar} , C-16), 75.2 (CH, C-7), 74.2 (CH, C-5), 70.2 (CH, d, $^1\text{J}(\text{C},\text{P}) = 185$ Hz, C-4), 67.7 (CH_2 , C-10), 50.7 (CH, C-2), 47.0 (CH, C-11), 33.7 (CH_2 , C-3), 23.4 (CH_3 , C-6, C-8).

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 121 MHz): 16.9 (d, $^1\text{J}(\text{P},\text{P}) = 26$ Hz, Phosphonat), -3.3 (d, $^1\text{J}(\text{P},\text{P}) = 27$ Hz, Phosphat).

7.2.8 Versuch zur Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-di-*tert*-butylphosphato-4-di-*tert*-butyl-phosphono-buttersäure-benzylester (Z-Appb(*t*Bu₄)-OBzl)

32 mg Natriumhydrid (0.78 mmol) wurden in 10 ml THF suspendiert und mit 150 μ l Di-*tert*-Butylphosphit (0.78 mmol) versetzt. Nach Bändigung der Gasentwicklung wurde die Lösung von Rückständen abdekantiert. 100 mg Säurechlorid **1** (0.266 μ mol) wurden in 10 ml THF gelöst und portionsweise mit der Phosphitsalzlösung versetzt. Nach 12 Stunden Rühren wurde der Ansatz mit 15 ml Phosphatpuffer (1 M, pH 7.0) versetzt, und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und eingeeengt.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): Die Signale konnten den Edukten zugeordnet werden, es fehlte das Produktsignal für H-3.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 121 MHz): Neben dem Hauptsignal des Edukts traten nur kleine Signale auf, die nicht dem Produkt zugeordnet werden konnten.

7.2.9 Versuch zur Darstellung von 2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-dibenzylphosphato-4-dibenzylphosphono-buttersäure-benzylester (Z-Appb(Bzl₄)-OBzl)

8 mg Natriumhydrid (0.2 mmol) wurden in 3 ml THF suspendiert und mit 44 µl Dibenzylphosphit (0.14 mmol) versetzt. Nach Bändigung der Gasentwicklung wurde die Lösung von Rückständen abdekantiert. 50 mg Säurechlorid **1** (0.13 mmol) wurden in 2 ml THF gelöst und portionsweise mit der Phosphitsalzlösung versetzt. Nach 96 Stunden Rühren wurde der Ansatz mit 5 ml Phosphatpuffer (1 M, pH 7.0) versetzt, und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und eingengt.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): Die Signale konnten den Edukten zugeordnet werden, es fehlte das Produktsignal für H-3.

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): Neben dem Hauptsignal des Edukts traten nur kleine Signale auf, die nicht dem Produkt zugeordnet werden konnten.

7.3 Darstellung der Hydroxyphosphonat-Derivate

7.3.1 Darstellung von N-(Benzyloxycarbonyl)-L-homoserin-benzylester (Z-Hse-OBzl, **5**)

2.5 g N-(Benzyloxycarbonyl)-L-asparaginsäure-1-benzylester (7 mmol) wurden in 20 ml Dimethoxyethan auf -20 °C bis -30 °C gekühlt, mit 860 µl N-Methylmorpholin (8.75 mmol) versetzt und 3 Minuten gerührt. Nach Zugabe von 1.2 ml Isobutylchloroformiat (8.75 mmol) wurde weitere 3 Minuten gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit 15 ml Dimethoxyethan gewaschen. Das Filtrat wurde auf -20 °C bis -30 °C gekühlt und mit 400 mg Natriumborhydrid (10.5 mmol) in 5 ml Wasser versetzt. Nach 30 Sekunden wurden 60 ml Wasser zugesetzt, und das Gemisch wurde mit Ethylacetat (3 x 30 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und eingengt, es ergaben sich 2.36 g Produkt **5** (6.9 mmol, 98 % Ausbeute).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.3-7.4 (m, 10 H, H_{ar}), 5.72 (d, 1 H, NH), 5.17 (m, 2 H, H-6), 5.11 (m, 2 H, H-11), 4.58 (m, 1 H, H-2), 3.67 (m, 2 H, H-4), 1.95 (dm, 2 H, H-3).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 172.3 (C, C-1), 156.8 (C, C-5), 136.0 (C, C-7), 135.1 (C, C-12), 128.1-128.6 (CH_{ar}), 67.4 (CH_2 , C-6), 67.3 (CH_2 , C-11), 58.3 (CH_2 , C-4), 51.4 (CH, C-2), 35.6 (CH_2 , C-3).

7.3.2 Darstellung von N-(Benzyloxycarbonyl)-L-asparaginaldehyd-benzylester (Z-Asa-OBzl, **6**)

5.25 ml Oxalylchlorid (2 M in CH_2Cl_2) in 10 ml CH_2Cl_2 wurden auf $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. 1.5 ml DMSO (21 mmol) in 2 ml CH_2Cl_2 wurden über 15 Minuten zugesetzt und 10 Minuten gerührt. 2.36 g des Homoserins **5** (6.9 mmol) in 5 ml CH_2Cl_2 wurden über 25 Minuten zugesetzt, und es wurde eine Stunde bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. 5.84 ml Triethylamin (42 mmol) wurden zugegeben und über weitere 15 Minuten bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurden 30 ml Wasser zugesetzt und es wurde mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit 0.1 M HCl, ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, die wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt (2.34 g) wurde mit Säulenchromatographie (Gradient S4) gereinigt und lieferte 1.53 g Produkt **6** (4.49 mmol, 65 % Ausbeute).

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz): 9.79 (s, 1 H, CHO), 7.3-7.4 (m, 10 H, H_{ar}), 5.69 (d, 1 H, NH), 5.17 (s, 2 H, H-6), 5.10 (s, 2 H, H-11), 4.69 (m, 1 H, H-2), 3.09 (qd, 2 H, H-3).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 199.1 (CHO, C-4), 170.5 (C, C-1), 155.9 (C, C-5), 136.0 (C, C-7), 135.0 (C, C-12), 128.2-128.6 (CH_{ar}), 67.7 (CH_2 , C-6), 67.1 (CH_2 , C-11), 49.2 (CH, C-2), 45.7 (CH_2 , C-3).

7.3.3 Darstellung von Trimethylsilyl-diisopropylphosphit (TMS-O-P(OiPr)₂)

0.4 mg Natriumhydrid (60 % in Öl, 10 mmol) wurden in 25 ml THF suspendiert und mit 1.66 ml Diisopropylphosphit (10 mmol) versetzt. Nach 1 Stunde wurde die Lösung von Rückständen abdekantiert und mit 1.9 ml Trimethylsilylchlorid (15 mmol) versetzt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, der klare Überstand im Vakuum ohne Erwärmen eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 1.612 g Substanz isoliert, die sich laut ^{31}P -NMR aus 80 %

Produkt (1.29 g, 5.4 mmol, 54 % Ausbeute) und 20 % Edukt (322 mg, 1.9 mmol, 19 %) zusammensetzten.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 4.63 (m, *i*Pr Edukt), 4.40 (m, 2 H, *i*Pr Produkt), 1.32 (m, *i*Pr Edukt), 1.21 (m, 12 H, *i*Pr Produkt), 0.21 (s, 9 H, TMS).

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): 130.0 (Produkt, 80 %), 5.6 (Edukt, 20 %).

7.3.4 Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-diisopropylphosphono-4-hydroxy-buttersäure-benzylester (Z-Ahpb(*i*Pr₂)-OBzl, 7a)

In Vorversuchen (Tab. 7.2) wurden je 50 mg Asparaginaldehyd **6** (0.145 mmol) in 3 ml Lösungsmittel gelöst und mit 25 µl Diisopropylphosphit (0.145 mmol) und 0.145 mmol des Reagenzes (s. Tab. 7.2) versetzt. Die Umsetzung wurde mit HPLC-Messungen verfolgt. Im Falle des TMS-Phosphits wurde das Rohprodukt verschiedenen Aufarbeitungsprozeduren unterworfen, um die TMS-Gruppe abzuspalten.

Tabelle 7.2: Umsetzung des Aldehyds **6** mit Diisopropylphosphit, verschiedene Reagenzien

Reagenz	Aufarbeitung	Ergebnis
DBU	-	keine Reaktion
NMM	-	keine Reaktion
DIEA	-	keine Reaktion
TEA	-	keine Reaktion
TMS-Phosphit	SiO ₂ -Platte, -Säule	unvollst. TMS-Spaltung
	Wasser, erhitzen	Zersetzung des Produkts
	rühren mit K ₂ CO ₃ /MeOH	Zersetzung des Produkts
	rühren mit Citronensäure/MeOH	vollst. TMS-Spaltung

Zur optimierten Umsetzung wurden 1 ml Diisopropylphosphit (6 mmol) und 835 µl Triethylamin (6 mmol) in 10 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit 760 µl Trimethylsilylchlorid (6 mmol) versetzt. 1 g Asparaginaldehyd **6** (2.9 mmol) wurde in 10 ml Dichlormethan gelöst, mit der Suspension versetzt und 12 Stunden gerührt. Nach Zugabe von 30 ml Wasser wurde mit Ethylacetat ex-

trahiert. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde in 10 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 50 mg Zitronensäure eine Stunde gerührt. Das Produkt wurde mit einem Gemisch aus 5 ml ges. NaHCO_3 -Lösung, 15 ml Wasser und 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wurde erneut mit Ethylacetat extrahiert, und die organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt (1.72 g) wurde mit Säulenchromatographie (Gradient S2) und präp. HPLC (C_{18} -Säule, Gradient P1) gereinigt und ergab 0.94 g an **7a** (1.9 mmol, 66 % Ausbeute).

^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 7.32 (m, 10 H, H_{ar}), 6.0 (dd, 1 H, NH), 5.17 (s, 2 H, H-8), 5.09 (s, 2 H, H-13), 4.63 (m, 3 H, H-5, H-2), 3.91 (m, 1 H, H-4), 2.13 (dm, 2 H, H-3), 1.26 (m, 12 H, H-6).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 171.8 (C, C-1), 156.8 (C, C-7), 136.1 (C, C-9), 135.2 (C, C-14), 128.1-128.6 (CH, CH_{ar}), 71.4 (CH, C-5), 67.4 (CH_2 , C-8), 67.2 (CH_2 , C-13), 64.7 (CH, d, $^1\text{J}(\text{C},\text{P}) = 169$ Hz, C-4), 51.5 (CH, C-2), 34.3 (CH_2 , C-3), 23.9 (CH_3 , C-6).

^{31}P -NMR (CDCl_3 , 162 MHz): 23.1 (Phosphonat), 22.9 (Phosphonat).

7.3.5 Darstellung von (2L)-2-Amino-4-diisopropylphosphono-4-hydroxy-buttersäure (Ahp*b*(*i*Pr₂), **8a**)

100 mg der geschützten Aminosäure **7a** wurden in 5 ml Essigsäure gelöst und mit 100 mg Palladiumhydroxid auf Kohle (entspr. 20 mg Pd) versetzt. Die Luft wurde durch Anlegen von Wasserstrahlvakuum entfernt, und es wurde mit Wasserstoff belüftet. Es wurde 1.5 Stunden unter Wasserstoffatmosphäre hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und mit Essigsäure gewaschen. Das Filtrat wurde lyophilisiert und ergab 55 mg an **8a** (0.19 mmol, 99 % Ausbeute).

^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz): 4.72 (m, 2 H, H-5), 4.26 (s, 1 H, H-2), 4.00 (m, 1 H, H-4), 2.32 (m, 2 H, H-3), 1.33 (m, 24 H, H-6).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 173.8 (C, C-1), 71.7-72.1 (CH, C-5), 66.0 (CH, d, $^1\text{J}(\text{C},\text{P}) = 169$ Hz, C-4), 52.5 (CH, d, C-2), 31.7 (CH_2 , C-3), 23.8-24.0 (CH_3 , C-6).

^{31}P -NMR (CDCl_3 , 121 MHz): 23.4 (s, Phosphonat, Diastereomer I), 23.1 (s, Phosphonat, Diastereomer II).

7.3.6 Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-diisopropylphosphono-4-hydroxy-buttersäure (Fmoc-Ahpb(*i*Pr₂)-OH, **9a**)

297 mg der Aminosäure **8a** (1.05 mmol) und 548 μ l DIEA (3.15 mmol) wurden in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit 516 mg Fmoc-Chlorid (2 mmol) in 5 ml CH₂Cl₂ versetzt. Nach 3 Stunden wurden weitere 258 mg Fmoc-Cl (1 mmol) zugegeben, und es wurde über Nacht gerührt. Nach Ansäuern mit Essigsäure auf pH < 5 wurde die Lösung eingeeengt und das Rohprodukt (300 mg) mit präp. HPLC gereinigt (C₁₈-Säule, Gradient P1, ohne TFA). Es wurden zwei Produkte erhalten: Das früher eluierte Produkt **9a** war die gewünschte Aminosäure (26 mg, 51 μ mol, 5.1 % Ausbeute), das später eluierte Produkt war das Lacton dieser Verbindung (36 mg, 74 μ mol, 7.1 % Ausbeute). Der Einsatz von 674 mg Fmoc-OSuc unter sonst identischen Bedingungen führte zu einem ähnlichen Ergebnis.

Produkt 1:

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.71 (d, 2 H, H-14), 7.57 (m, 2 H, H-11), 7.34 (m, 2 H, H-13), 7.26 (m, 2 H, H-12), 6.20 (dd, 1 H, NH), 4.75 (m, 3 H, H-5, H-2), 4.33 (d, 2 H, H-8), 4.20 (m, 1 H, H-9), 3.97 (m, 1 H, H-4), 2.25 (m, 2 H, H-3), 1.34 (m, 12 H, H-6).

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): 24.2 (Phosphonat, Diastereomer I), 23.2 (Phosphonat, Diastereomer II).

Maldi-MS: 505 [M+H]⁺, 527 [M+Na]⁺, 543 [M+K]⁺.

Produkt 2:

¹H-NMR, Zuordnung nach H,H-COSY (CDCl₃, 400 MHz): 7.73 (d, 2 H, H-14), 7.57 (m, 2 H, H-11), 7.37 (m, 2 H, H-13), 7.29 (m, 2 H, H-12), 5.88 (dd, 1 H, NH), 4.75 (m, 2 H, H-5), 4.59 (m, 1 H, H-2), 4.51 (m, 1 H, H-4), 4.39 (m, 2 H, H-8), 4.20 (m, 1 H, H-9), 2.34-2.88 (m, 2 H, H-3), 1.34 (m, 12 H, H-6).

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): 17.3 (Phosphonat).

Maldi-MS: 487 [M+H]⁺, 509 [M+Na]⁺, 526 [M+K]⁺.

10 mg der offenkettigen Aminosäure **9a** (19.6 μ mol) wurden in 300 μ l DMF gelöst und mit 6.3 mg TBTU (19.6 μ mol) sowie 6.8 μ l DIEA (39.2 μ mol) versetzt. Nach 30 Minuten wurde eine HPLC-Messung durchgeführt. Der Eduktpeak hatte stark abgenommen, ein Peak bei der Retentionszeit des Lactons trat auf.

7.3.7 Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-diisopropylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure-benzylester (Z-Ahpb(THP, *i*Pr₂)-OBzl, 10a)

527 mg der Aminosäure **7a** (1.04 mmol) wurden in 15 ml Toluol gelöst und mit 0.46 ml Dihydropyran (5.1 mmol) sowie 0.5 ml p-Toluolsulfonsäure in Toluol versetzt. Nach Reaktion über Nacht wurden ca. 500 mg trockenes Natriumcarbonat zugesetzt und für 1 Stunde gerührt. Durch Zugabe von 5 ml ges. NaHCO₃-Lösung, 15 ml Wasser und 20 ml Ethylacetat wurde das Gemisch aufgearbeitet. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und eingeeengt, das Rohprodukt (660 mg) mit präp. HPLC (C₁₈-Säule, Gradient P1) gereinigt. Neben 469 mg Produkt **10a** (0.79 mmol, 76 % Ausbeute) wurden 40 mg Edukt (79 µmol, 7 %) isoliert. Die Verwendung von 20 mg des sauren Ionenaustauschers Dowex bzw. 0.1 ml HCl_{konz} führte nicht zu einer Umsetzung.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.33 (m, 10 H, H_{ar}), 6.52 (dd, 1 H, NH), 5.17 (m, 2 H, H-13), 5.10 (m, 2 H, H-18), 4.80 (m, 1 H, H-7), 4.69 (m, 2 H, H-5), 4.55 (m, 1 H, H-2), 4.00 (m, 2 H, H-11), 3.41 (m, 1 H, H-4), 2.22 (m, 2 H, H-3), 1.77 (m, 3 H, H-8, -9, -10), 1.46 (m, 3 H, H-8, -9, -10), 1.28 (m, 12 H, H-6).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 171.5 (C, C-1), 156.3 (C, C-12), 136.6 (C, C-14), 135.5 (C, C-19), 128.1-128.6 (CH, CH_{ar}), 100.9 (CH, C-7), 72.0 (CH, C-5), 71.1 (CH, C-5), 66.9 (CH₂, C-13), 66.5 (CH₂, C-18), 67.4 (CH, d, ¹J(C,P) = 169 Hz, C-4), 64.9 (CH₂, C-11), 51.7 (CH, C-2), 31.7 (CH₂, C-3), 30.9 (CH₂, C-8), 24.9 (CH₂, C-9), 24.0 (CH₃, C-6), 21.2 (CH₃, C-10).

³¹P-NMR (CDCl₃, 121 MHz): 21.1 (Phosphonat, Diastereomer I), 20.9 (Phosphonat, Diastereomer II).

7.3.8 Darstellung von (2L)-2-Amino-4-diisopropylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure (Ahpb(THP, *i*Pr₂), 11a)

469 mg der geschützten Aminosäure **10a** (0.79 mmol) wurden in 10 ml Methanol gelöst und mit 500 mg Palladiumhydroxid auf Kohle (entspr. 100 mg Pd) versetzt. Die Luft wurde durch Anlegen von Wasserstrahlvakuum entfernt, und es wurde mit Wasserstoff belüftet sowie 2 Stunden unter Wasserstoffatmosphäre hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, mit Metha-

nol gewaschen und das Filtrat wurde lyophilisiert. Es wurden 288 mg Produkt **11a** erhalten (0.78 mmol, 99 % Ausbeute).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 4.69 (m, 3 H, H-5, H-7), 4.16 (m, 1 H, H-1), 3.95 (m, 2 H, H-11), 3.45 (m, 1 H, H-4), 2.26 (m, 2 H, H-3), 1.78 (m, 2 H, H-8), 1.44 (m, 4 H, H-9, H-10), 1.29 (m, 12 H, H-6).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): 173.7 (C, C-1), 102.0 (CH, C-7), 73.9 (CH, d, ¹J(C,P) = 169 Hz, C-4, Diastereomer I), 72.0 (CH, C-5), 69.9 (CH, d, ¹J(C,P) = 168 Hz, C-4, Diastereomer II), 66.1 (CH₂, C-11), 51.6 (CH, C-2), 31.9 (CH₂, C-8), 31.3 (CH₂, C-3), 25.3 (CH₂, C-10), 24.5 (CH₃, C-6), 21.7 (CH₂, C-9).

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): 21.3 (Phosphonat, Diastereomer I), 20.2 (Phosphonat, Diastereomer II).

7.3.9 Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-diisopropylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure (Fmoc-Ahpb(THP, *i*Pr₂)-OH, **12a**)

755 mg der Aminosäure **11a** (2.05 mmol) und 1.074 ml DIEA (6.17 mmol) wurden in 50 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit 1.586 g Fmoc-Chlorid (6.17 mmol) versetzt. Nach 2 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum ohne Erwärmen abgezogen und das Rohprodukt mit Säulenchromatographie gereinigt (Gradient S1). Das eluierte Produkt wurde aus Dioxan lyophilisiert und ergab 685 mg an **12a** (1.16 mmol, 57 % Ausbeute). Der Einsatz von Fmoc-OSuc in einem 0.2 mmol Ansatz ergab eine Ausbeute von 54 %.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.74 (d, 2 H, H-19), 7.61 (dd, 2 H, H-16), 7.37 (dd, 2 H, H-18), 7.29 (d, 2 H, H-17), 6.57 (d, 1 H, NH), 4.75 (m, 3 H, H-5, H-7), 4.56 (m, 1 H, H-2), 4.35 (d, 2 H, H-13), 4.21 (m, 1 H, H-14), 4.15 (m, 1 H, H-11), 3.92 (m, 1 H, H-11), 3.46 (m, 1 H, H-4), 2.29 (dm, 2 H, H-3), 1.80 (m, 2 H, H-8), 1.48 (m, 4 H, H-9, H-10), 1.31 (m, 12 H, H-6).

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): 174.6 (C, C-1), 156.1 (C, C-12), 143.7 (C, C-15), 140.7 (C, C-20), 127.2 (CH_{ar}, C-18), 126.6 (CH_{ar}, C-17), 124.9 (CH_{ar}, C-16), 119.4 (CH_{ar}, C-19), 99.9 (CH, C-7), 71.1 (CH, C-5), 68.5 (CH, d, ¹J(C,P) = 170 Hz, C-4), 66.2 (CH₂, C-13), 61.9 (CH₂, C-11), 49.5 (CH, C-2), 46.4 (CH, C-14), 33.8 (CH₂, C-3), 30.2 (CH₂, C-8), 25.0 (CH₂, C-10), 24.8 (CH₂, C-9), 23.6 (CH₃, C-6).

³¹P-NMR (CDCl₃, 121 MHz): 21.1 (Phosphonat).

7.3.10 Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-di-*tert*-butylphosphono-4-hydroxy-buttersäure-benzylester (Z-Ahpb(*t*Bu₂)-OBzl, **7b**)

Zur Probeumsetzung wurden 50 mg des Aldehyds (0.145 mmol) mit 29 µl Di-*tert*-butylphosphit (0.145 mmol) und 22 mg CsF (0.145 mmol) versetzt, und die Reaktion wurde mit HPLC verfolgt. Es war keine Umsetzung zu erkennen.

0.97 ml Di-*tert*-butylphosphit (5 mmol) und 765 µl Triethylamin (5.5 mmol) wurden in 5 ml CH₂Cl₂ gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 635 µl Trimethylsilylchlorid versetzt. Die Lösung wurde filtriert und zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 1.134 g Asparaginaldehyd **6** (3.32 mmol) in 10 ml CH₂Cl₂ gegeben. Nach 2 Stunden wurde das Gemisch mit 20 ml Phosphatpuffer (1 M, pH 7) versetzt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und eingeeengt, das Rohprodukt mit präp. HPLC (C₁₈-Säule, Gradient P1) gereinigt. Es wurden 1.412 g Produkt **7b** (2.64 mmol, 80 % Ausbeute) erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.31 (m, 10 H, H_{ar}), 6.28 (t, 2 H, NH), 5.15 (s, 2 H, H-8), 5.08 (s, 2 H, H-13), 4.57 (m, 1 H, H-2), 4.17 (br., 1 H, OH), 3.82 (m, 1 H, H-4), 2.16 (m, 2 H, H-3), 1.42 (s, 9 H, H-6), 1.39 (s, 9 H, H-6).

³¹P-NMR (CDCl₃, 121 MHz): 17.2 (s, Phosphonat, Diastereomer I), 16.8 (s, Phosphonat, Diastereomer II).

7.3.11 Darstellung von (2L)-2-Amino-4-di-*tert*-butylphosphono-4-hydroxy-buttersäure (Ahpb(*t*Bu₂), **8b**)

330 mg der geschützten Aminosäure **7b** (0.65 mmol) wurden in 10 ml Essigsäure gelöst und mit 300 mg Palladiumhydroxid auf Kohle (entspr. 60 mg Pd) versetzt. Die Luft wurde durch Anlegen von Wasserstrahlvakuum entfernt, und es wurde mit Wasserstoff belüftet sowie 1,5 Stunden unter Wasserstoffatmosphäre hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, mit

Essigsäure gewaschen, und das Filtrat wurde lyophilisiert. Es wurden 200 mg Produkt **8b** erhalten (0.64 mmol, 98 % Ausbeute).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 3.98 (m, 2 H, H-2, H-4), 2.21 (m, 2 H, H-3), 1.44 (s, 18 H, H-6).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): 173.7 (C, C-1), 83.1 (C, C-5), 52.4 (CH, C-2), 32.2 (CH₂, C-3), 30.4 (CH₃, C-6).

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): 17.7 (s, Phosphonat)

7.3.12 Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-di-*tert*-butylphosphono-4-hydroxy-buttersäure (Fmoc-Ahpb(*t*Bu₂)-OH, **9b**)

100 mg der Aminosäure **8b** (0.32 mmol) wurden in 10 ml Methanol und 10 ml Acetonitril gelöst und mit 400 µl DIEA (2.3 mmol) versetzt. Fmoc-OSuccinimid wurde portionsweise zugesetzt (insgesamt 130 mg, 0.39 mmol), bis die Reaktion laut DC vollständig war (ca. 12 h). Die Lösung wurde eingengt und das Rohprodukt mit präp. HPLC (C₁₈-Säule, Gradient P1, mit 2 % AcOH) gereinigt. Es wurden 124 mg Substanz isoliert, in der als Verunreinigung abreagiertes Fmoc-Derivat (Fmoc-X) enthalten war (laut NMR ca. 40 % der Gesamtmenge). Daraus ergab sich die Menge an reiner Aminosäure **9b** zu 75 mg (0.14 mmol, 44 % Ausbeute).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.74 (m, 2 H, H-14, Fmoc-X), 7.60 (m, 2 H, H-11, Fmoc-X), 7.34 (m, 4 H, H-13, H-12, Fmoc-X), 6.36 (d, 1 H, NH), 4.69 (m, 1 H, H-2), 4.47 (d, 2 H, Fmoc-X), 4.40 (d, 1 H, Fmoc-X), 4.33 (m, 2 H, H-8), 4.24 (m, 2 H, H-4, H-9), 2.22 (m, 2 H, H-3), 1.53 (s, 9 H, H-6), 1.49 (s, 9 H, H-6).

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): 16.7 (s, Phosphonat)

10 mg des Produkts **9b** (18.6 µmol) wurden in 300 µl DMF gelöst und mit 6 mg TBTU (18.6 µmol) sowie 6.5 µl DIEA (37.2 µmol) versetzt. Nach 30 Minuten wurde eine HPLC-Messung durchgeführt. Der Eduktpeak war nur noch schwach zu erkennen und neue Peaks traten bei höheren Retentionszeiten auf, es konnten allerdings keine Molekülmassen ermittelt werden.

7.3.13 Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-di-*tert*-butylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure-benzylester (Z-Ahpb(THP, *t*Bu₂)-OBzl, **10b**)

570 mg der Aminosäure **7b** (1.067 mmol) wurden in 5 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit 54 mg Pyridinium-toluolsulfonat (0.2 mmol) sowie 180 µl Dihydropyran (2.34 mmol) versetzt. Nach Reaktion über Nacht wurden 5 ml Phosphatpuffer (1 M, pH 7) zugesetzt, die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Die Reinigung erfolgte mit präp. HPLC (C₁₈-Säule, Gradient P1, 5 mM NH₄HCO₃ in Wasser als Puffer A, pH 7.8), von den Fraktionen wurde das Methanol abgezogen und das Produkt **10b** mit CH₂Cl₂ extrahiert und isoliert: 440 mg (0.71 mmol, 67 % Ausbeute).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 7.33 (m, 10 H, H_{ar}), 6.60 (dd, 1 H, NH), 5.17 (m, 2 H, H-13), 5.11 (m, 2 H, H-18), 4.84 (m, 1 H, H-7), 4.59 (m, 1 H, H-2), 3.90 (m, 2 H, H-11), 3.42 (m, 1 H, H-4), 2.28 (m, 2 H, H-3), 1.71 (m, 2 H, H-8), 1.51 (m, 4 H, H-9, H-10), 1.48 (m, 9 H, H-6), 1.43 (m, 9 H, H-6).

7.3.14 Darstellung von (2L)-2-Amino-4-di-*tert*-butylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure (Ahpb(THP, *t*Bu₂), **11b**)

440 mg der geschützten Aminosäure **10b** (0.71 mmol) wurden in 40 ml Ethanol gelöst und mit 250 mg Palladiumhydroxid auf Kohle (entspr. 50 mg Pd) versetzt. Die Luft wurde durch Anlegen von Wasserstrahlvakuum entfernt, es wurde mit Wasserstoff belüftet und 2 Tage unter Wasserstoffatmosphäre hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, mit Ethanol gewaschen, das Filtrat wurde eingeeengt und der Rückstand aus Dioxan lyophilisiert. Da das Rohprodukt noch Edukt enthielt, konnte keine Ausbeute angegeben werden, und das Produkt **11b** wurde weiter umgesetzt.

7.3.15 Versuch zur Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-di-*tert*-butylphosphono-4-(tetrahydropyran-2'-yloxy)-buttersäure (Fmoc-Ahpb(THP, *t*Bu₂)-OH, 12b)

Das Rohprodukt **11b** wurde in 10 ml Methanol und 10 ml Acetonitril gelöst und mit 500 µl DIEA (2.9 mmol) versetzt. 480 mg Fmoc-OSuccinimid (1.43 mmol) wurden portionsweise zugesetzt, und die Umsetzung wurde über DC verfolgt. Nach Rühren über Nacht war kein Produkt zu erkennen.

7.3.16 Darstellung von (2L)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-4-di-*tert*-butylphosphono-4-(methoxyethoxymethoxy)-buttersäure-benzylester (Z-Ahpb(MEM, *t*Bu₂)-OBzl, 10c)

620 mg der Aminosäure **7b** (1.16 mmol) wurden in 10 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit 500 µl DIEA (2.87 mmol) sowie 1 ml Methoxyethoxymethylchlorid (8.1 mmol) versetzt. Nach Reaktion über Nacht wurde die Lösung auf ein geringes Volumen eingeeengt und mit präp. HPLC (C₁₈-Säule, Gradient P1) gereinigt. Es konnten 430 mg an **10c** (0.69 mmol, 59 % Ausbeute) isoliert werden.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.25 (m, 10 H, H_{ar}), 6.31 (m, 1 H, NH), 5.10 (m, 2 H, H-12), 5.04 (m, 2 H, H-17), 4.58 (dm, 1 H, H-2), 4.36 (dm, 1 H, H-4), 3.77 (m, 2 H, H-7), 3.45 (m, 4 H, H-8, H-9), 3.23 (m, 3 H, H-10), 2.26 (dm, 2 H, H-3), 1.38 (m, 18 H, H-6).

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): 15.1 (Phosphonat, Diastereomer I), 15.0 (Phosphonat, Diastereomer II).

7.3.17 Darstellung von (2L)-2-Amino-4-di-*tert*-butylphosphono-4-(methoxyethoxymethoxy)-buttersäure (Ahpb(MEM, *t*Bu₂), 11c)

430 mg der geschützten Aminosäure **10c** (0.69 mmol) wurden in 20 ml Essigsäure gelöst und mit 450 mg Palladiumhydroxid auf Kohle (entspr. 90 mg Pd) versetzt. Die Luft wurde durch Anlegen von Wasserstrahlvakuum entfernt, es wurde mit Wasserstoff belüftet und 3 Stunden unter Wasserstoffatmosphäre hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, mit Essigsäure gewaschen, das Filtrat wurde eingeeengt und der Rückstand aus Dioxan lyophilisiert. Es wurden

260 mg Produkt **11c** erhalten (0.65 mmol, 94 % Ausbeute).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 4.90 (m, 1 H, H-4), 4.77 (m, 1 H, H-2), 3.90 (m, 2 H, H-8), 3.72 (m, 2 H, H-9), 3.47 (s, 2 H, H-7), 3.28 (m, 3 H, H-10), 2.25 (m, 2 H, H-3), 1.43 (m, 18 H, H-6).

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): 14.7 (s, Phosphonat, Diastereomer I), 14.4 (s, Phosphonat, Diastereomer II).

7.3.18 Darstellung von (2L)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-di-*tert*-butylphosphono-4-(methoxyethoxymethoxy)-buttersäure (Fmoc-Ahpb(MEM, *t*Bu₂)-OH, **12c**)

260 mg der Aminosäure **11c** (0.65 mmol) wurden in 3 ml Methanol und 3 ml Acetonitril gelöst und mit 570 µl DIEA (3.28 mmol) versetzt. 653 mg Fmoc-OSuccinimid (1.95 mmol) wurden portionsweise zugesetzt. Nach Reaktion über Nacht wurden 10 ml Phosphatpuffer (1 M, pH 7) zugesetzt und das Produkt wurde mit Ethylacetat, CH₂Cl₂ und Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt, das Rohprodukt mit Säulenchromatographie (Gradient S3) gereinigt. Von den Diastereomeren **12c** wurden 180 mg (0.29 mmol, 46 % Ausbeute) bzw. 120 mg (0.19 mmol, 30 % Ausbeute) isoliert.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.72 (d, 2 H, H-18), 7.60 (m 2 H, H-15), 7.32 (m 2 H, H-17), 7.25 (m, 2 H, H-16), 6.32 (d, 1 H, NH), 5.00 (s, 4 H), 4.74 (m, 1 H, H-2), 4.40 (m, 4 H), 4.14 (m, 5 H), 3.89 (m, 3 H), 3.5-3.8 (m, Dioxan), 3.31 (s, 3 H, H-10), 2.27 (dm, 2 H, H-3), 1.48 (m, 9 H, H-6), 1.44 (m, 9 H, H-6).

³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz): Diastereomer I: 15.1 (s, Phosphonat); Diastereomer II: 15.0 (s, Phosphonat).

7.4 Synthese der Peptidsequenz 1

7.4.1 Synthese der Peptidsequenz 1.0 (A-A-E-G-G-S-S-N-V-F-S-K-NH₂), mit und ohne acetyliertem N-Terminus

Die Peptide wurden mit einer Ansatzgröße von je 60 µmol automatisch synthetisiert (Abimed), die Aminosäuren wurden als Doppelkopplungen im vierfachen Überschuß für je 60 Minuten gekoppelt. Das N-terminal acetylierte Peptid wurde für 1 Stunde gecappt und die Peptide wurden mit 10 ml „Silan“ für 3 Stunden abgespalten. Nach Aufarbeitung ohne Reinigung wurden 70 mg reines Acetylpeptid (54.2 µmmol, 90 % Ausbeute) und 69 mg Peptid (48.3 µmol, 81 % Ausbeute) erhalten.

¹H-NMR des nicht acetylierten Peptids, Zuordnung durch H,H-COSY (D₂O, 300 MHz):

7.20 (m, 5 H, H_{ar} Phe), 4.58 (m, 2 H, H α Phe, H α Asn), 4.36 (m, 2 H, H α Ser, H α Glu), 4.26 (m, 3 H, 2 x H α Ser, H α Ala), 4.15 (m, 1 H, H α Lys), 3.97 (m, 1 H, H α Ala), 3.88 (m, 5 H, 2 x 2 H α Gly, H α Val), 3.72-3.75 (m, 6 H, 3 x 2 H β Ser), 3.07 (m, 1 H, H β Phe), 2.89 (m, 3 H, H β Phe, 2 H ϵ Lys), 2.64 (t, 2 H, 2 H β Asn), 2.38 (t, 2 H, 2 H γ Glu), 2.04 (m, 1 H, H β Glu), 1.89 (m, 2 H, H β Glu, H β Val), 1.75 (m, 1 H, H β Lys), 1.61 (m, 3 H, H β Lys, 2 H δ Lys), 1.43 (d, 3 H, 3 H β Ala), 1.36 (m, 2 H, 2 H γ Lys), 1.28 (d, 3 H, 3 H β Ala), 0.68 (d, 6 H, 2 x 3 H γ Val).

7.4.2 Synthese der Peptidsequenz 1.1 (Ac-A-A-E-G-G-S-S(P)-N-V-F-S-K-NH₂)

7.4.2.1 Synthese mit globaler Phosphorylierung

Das unphosphorylierte Peptid wurde mit einer Ansatzgröße von 60 µmol automatisch synthetisiert (Abimed), die Aminosäuren wurden im vierfachen Überschuß für 40 Minuten gekoppelt, wobei Ser⁷ ungeschützt eingesetzt wurde. Ala¹ wurde als voracetylierter Baustein manuell gekoppelt: 63 mg Ac-Ala (240 µmol), 154 mg TBTU (240 µmol) und 106 µl NMM (480 µmol) wurden in 1.2 ml DMF gelöst und auf das Harz gegeben. Ein BPB-Test ergab 6 % noch freie Aminogruppen. Zur globalen Phosphorylierung wurde das Harz im Hochvakuum getrocknet, unter Argon mit 420 mg Tetrazol (6 mmol) und 1.5 ml Di-*tert*-butyl-N,N'-diethylphosphoramidit (6 mmol) in 1.5 ml DMF versetzt und 24 Stunden geschüttelt. Es wurden 3.7 ml

tert-Butylhydroperoxid (80 % in Di-*tert*-butylperoxid) zugesetzt, wobei sich das Gemisch erwärmte. Nach weiteren 43 Stunden wurde das Harz abfiltriert. Da bei einer Probespaltung ein Großteil des Peptids noch unphosphoryliert vorlag, wurde die Phosphorylierung mit identischen Mengen für 20 bzw. 24 Stunden wiederholt. Das Harz wurde mit DMF gewaschen, das Peptid mit 10 ml „Silan“ für 2.5 Stunden abgespalten, aufgearbeitet und mit präp. HPLC (C₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) gereinigt. Neben 45 mg Phosphat-Peptid **1.1** (32.8 μmol, 55 % Ausbeute) wurden 14 mg des *H*-Phosphonats erhalten (ca. 17 %).

7.4.2.2 Synthese mit vorphosphoryliertem Baustein

Das Peptid wurde mit einer Ansatzgröße von 160 μmol in zwei Abschnitten (Lys¹² bis Asn⁸, Gly⁵ bis Ala¹) automatisch synthetisiert (Milligen), die Aminosäuren wurden im vierfachen Überschuß für 30 Minuten gekoppelt. Phosphoserin⁷ wurde als Fmoc-Ser[P(O)(OH)(OBzl)]-OH manuell für 12 Stunden gekoppelt: 334 mg Aminosäure (670 μmol), 215 mg TBTU (670 μmol) und 351 μl DIEA (2.01 mmol) in 5 ml DMF. Ser⁶ wurde als Fmoc-Ser(*t*Bu) manuell für 1 Stunde gekoppelt: 257 mg Aminosäure (670 μmol), 215 mg TBTU (670 μmol) und 234 μl DIEA (1.34 mmol) in 1.5 ml DMF. Die Abspaltung erfolgte mit 5 ml „Silan“ für 4 Stunden, nach Aufarbeitung und HPLC-Reinigung (C₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) wurden 70 mg Peptid **1.1** (51 μmmol, 32 % Ausbeute) erhalten.

7.4.3 Versuch zur Synthese der Peptidsequenz **1.2** (Ac-A-A-E-G-G-S-S(TP)-N-V-F-S-K-NH₂)

7.4.3.1 Darstellung von Dibenzoyltetrasulfid (PhCO)₂S₄

18.3 g Thiobenzoesäure (0.133 mol) wurden in 150 ml THF gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 6 ml Dischwefeldichlorid (0.075 mol) versetzt. Nach Zutropfen von 17.8 ml Triethylamin (0.132 mol) in 100 ml THF über 20 Minuten wurde 1 Stunde gerührt, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Zur Reinigung wurde das Rohprodukt unter Erwärmen in 200 ml Ethylacetat gelöst, filtriert und durch Einengen mit Trocknung im Hochvakuum isoliert. Als Produkt wurden 22.3 g (0.066 mol, 100 % Ausbeute) erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 7.92 (d, 2 H, H-3), 7.59 (t, 1 H, H-5), 7.46 (t, 2 H, H-4).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): 187.1 (C, C-1), 135.2 (C, C-2), 134.4 (CH_{ar}, C-5), 129.0 (CH_{ar}, C-3), 128.1 (CH_{ar}, C-4).

7.4.3.2 Synthese mit globaler Thiophosphorylierung

Das unphosphorylierte Peptid wurde mit einer Ansatzgröße von 30 µmol automatisch synthetisiert (Abimed), die Aminosäuren wurden im vierfachen Überschuß für 40 Minuten gekoppelt, wobei Ser⁷ ungeschützt eingesetzt wurde. Ala¹ wurde als voracetylierter Baustein manuell gekoppelt: 63 mg Ac-Ala (240 µmol), 154 mg TBTU (240 µmol) und 106 µl NMM (480 µmol) wurden in 1.2 ml DMF gelöst und auf das Harz gegeben. Zur globalen Thiophosphorylierung wurde das Harz im Hochvakuum getrocknet, unter Argon mit 420 mg Tetrazol (6 mmol) und 1.5 ml Di-*tert*-butyl-N,N'-diethylphosphoramidit (6 mmol) in 1.5 ml DMF versetzt und 17 Stunden geschüttelt. Die Einführung des Schwefels erfolgte bei der ersten Variante durch Zugabe von 3.39 g Dibenzoyltetrasulfid (10 mmol) in 21.6 ml THF, wobei sich das Gemisch erwärmte. Nach 7 Stunden wurde filtriert, das Harz wurde nacheinander mit CS₂, DMF und Methanol gewaschen. In der zweiten Variante wurde das Harz abfiltriert, in ein Plastikgefäß überführt, unter Argon mit 30 mg *H*-1,2-Benzodithiol-3-one-1,1-dioxid (150 µmol) für 5 Stunden umgesetzt, abfiltriert und mit 10%iger Natriumpyrosulfitlösung und Methanol gewaschen. Das Peptid wurde mit 5 ml „Silan“ für 3 Stunden abgespalten, aufgearbeitet und mit präp. HPLC (C₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) gereinigt. Das Hauptprodukt war Phosphat-Peptid, daher ist keine Ausbeute bestimmt worden.

7.4.4 Synthese der Peptidsequenz 1.3 (Ac-A-A-E-G-G-S-Appb(R₄)-N-V-F-S-K-NH₂)

7.4.4.1 Synthese der Peptidsequenzen 1.3a (R = Et) und 1.3b (R = *i*Pr)

Die Peptide wurden mit einer Ansatzgröße von 15 µmol (**1.3a**) bzw. 20 µmol (**1.3b**) manuell synthetisiert. Die Appb-Derivate wurden im dreifachen Überschuß, alle anderen Aminosäuren im vierfachen Überschuß gekoppelt: Entschützung für 10 Minuten, Waschen, Kopplung mit 1 Äquivalent TBTU und 2 Äquivalenten DIEA in DMF für die angegebene Zeit, Waschen.

Nach jeder Entschützung (**1.3a**) und Kopplung (**1.3a** und **1.3b**) wurde ein BPB-Test durchgeführt, bei Bedarf wurde die Kopplung wiederholt und eventuell gecappt. Nach Abschluß der Synthese wurde der N-Terminus acetyliert (endgecappt). Die verwendeten Reaktionszeiten mit den gemessenen BPB-Werten sind in den Tabellen 7.3 sowie 7.4 aufgeführt.

Für die Isolierung des Peptids **1.3a** wurde das Harz mit 5 ml „Silan“ für 3 Stunden behandelt, nach Aufarbeitung ohne Reinigung wurden 18 mg reines Peptid **1.3a** (11.4 μmol , 76 % Ausbeute) erhalten.

Das Harz mit Peptid **1.3b** wurde in zwei Portionen geteilt. Eine Portion ($\sim 10 \mu\text{mol}$) wurde zur Abspaltung der Phosphorschutzgruppen gesondert behandelt (7.4.5.2, Var. 4), bei der anderen wurde das Peptid ebenfalls mit 5 ml „Silan“ für 3 Stunden abgespalten. Nach Aufarbeitung mit Reinigung wurden 9 mg Peptid **1.3b** (5.5 μmol , 55 % Ausbeute) erhalten.

Tabelle 7.3: Parameter für Peptid 1.3a

Aminosäure	Zeit	freie Aminogruppen	Beladung nach Fmoc-Abspaltung
Lys ¹²	1 h	0.13 μmol , 0.9 %	13.0 μmol , 87 %
	1 h	0.08 μmol , 0.6 %	
Ser ¹¹	1 h	0.22 μmol , 1.4 %	13.8 μmol , 92 %
	1 h	0.19 μmol , 1.2 %	
Phe ¹⁰	1 h	0.17 μmol , 1.2 %	14.4 μmol , 96 %
	0.5 h	0.15 μmol , 1.0 %	
Val ⁹	1 h	0.52 μmol , 3.5 %	14.0 μmol , 93 %
	1 h	0.49 μmol , 3.3 %	
	Capping	0.38 μmol , 2.5 %	
Asn ⁸	1 h	0.55 μmol , 3.7 %	14.4 μmol , 96 %
	1.5 h	0.51 μmol , 3.4 %	
	Capping	0.46 μmol , 3.0 %	
Appb(Et ₄) ⁷	1.5 h	2.64 μmol , 17.6 %	13.3 μmol , 89 %
	1.5 h	2.12 μmol , 14.1 %	
	Capping	0.72 μmol , 4.8 %	
Ser ⁶	1 h	0.44 μmol , 2.9 %	12.9 μmol , 86 %
	1 h	0.44 μmol , 2.9 %	

Gly ⁵	1 h	0.44 µmol, 2.9 %	12.9 µmol, 86 %
Gly ⁴	1 h	0.50 µmol, 3.3 %	12.7 µmol, 85 %
Glu ³	1 h	0.52 µmol, 3.4 %	12.1 µmol, 81 %
Ala ²	1.5 h	0.49 µmol, 3.3 %	12.4 µmol, 83 %
Ala ¹	1.5 h	0.53 µmol, 3.6 %	12.2 µmol, 81 %
Acylierung	1 h	0.43 µmol, 2.9 %	

Tabelle 7.4: Parameter für Peptid 1.3b

Aminosäure	Zeit	freie Aminogruppen	Beladung nach Fmoc-Abspaltung
Lys ¹²	1 h	0.49 µmol, 2.3 %	
Ser ¹¹	1 h	0.37 µmol, 1.7 %	
Phe ¹⁰	1 h	0.44 µmol, 2.0 %	
Val ⁹	1 h	0.48 µmol, 2.2 %	
Asn ⁸	1 h	0.47 µmol, 2.2 %	18.8 µmol, 88 %
Appb(<i>i</i> Pr ₄) ⁷	1 h	4.0 µmol, 21 %	
	1 h	2.3 µmol, 12 %	
Capping	1 h	0.58 µmol, 3.1 %	15.6 µmol, 74 %
Ser ⁶	1 h	1.0 µmol, 6.4 %	
	1 h	0.73 µmol, 4.7 %	
	14 h	0.45 µmol, 2.9 %	
Gly ⁵	1 h	0.34 µmol, 2.2 %	
Gly ⁴	1 h	0.59 µmol, 3.8 %	
	4 h	0.40 µmol, 2.6 %	
Glu ³	1 h	0.52 µmol, 3.4 %	
	1 h	0.59 µmol, 3.8 %	
	4 h	0.51 µmol, 3.3 %	
Ala ²	1 h	0.49 µmol, 3.1 %	
Ala ¹	1 h	0.54 µmol, 3.5 %	
	3 h	0.58 µmol, 3.7 %	
Acylierung	1 h	0.58 µmol, 3.7 %	

^1H -NMR des *iPr*-Peptids, Zuordnung durch Vergleich mit Peptid **1.0** (D_2O , 300 MHz):

7.30-7.35 (m, 5 H, H_{ar} Phe), 4.68-4.74 (m, 6 H, $\text{H}\alpha$ Appb, 4 x H *iPr*, $\text{H}\alpha$ Asn), 4.50 (t, 1 H, $\text{H}\alpha$ Phe), 4.42 (m, 3 H, 2 x $\text{H}\alpha$ Ser, $\text{H}\gamma$ Appb), 4.30 (m, 3 H, $\text{H}\alpha$ Ala, $\text{H}\alpha$ Glu, $\text{H}\alpha$ Lys), 4.01 („d“, 5 H, $\text{H}\alpha$ Ala, 2 x 2 $\text{H}\alpha$ Gly), 3.90 (m, 2 H, 2 $\text{H}\beta$ Ser), 3.83 (m, 3 H, 2 $\text{H}\beta$ Ser, $\text{H}\alpha$ Val), 3.16 (m, 1 H, $\text{H}\beta$ Phe), 3.02 („t“, 3 H, $\text{H}\beta$ Phe, 2 $\text{H}\epsilon$ Lys), 2.75 (m, 2 H, 2 $\text{H}\beta$ Asn), 2.51 (t, 2 H, 2 $\text{H}\gamma$ Glu), 2.19 (m, 2 H, $\text{H}\beta$ Appb), 2.04 („s“, 4 H, 3 H Ac, $\text{H}\beta$ Glu), 1.88 (m, 1 H, $\text{H}\beta$ Glu), 1.71 (m, 3 H, $\text{H}\beta$ Val, 2 $\text{H}\beta$ Lys), 1.54 (dm, 2 H, 2 $\text{H}\delta$ Lys), 1.39 (m, 32 H, 2 x 3 $\text{H}\beta$ Ala, 2 $\text{H}\gamma$ Lys, 8 x 3 H *iPr*), 0.84 (d, 6 H, 2 x 3 $\text{H}\gamma$ Val).

^{31}P -NMR des *iPr*-Peptids (D_2O , 121 MHz): 18.3 (d, $^3\text{J}(\text{P},\text{P}) = 25$ Hz, Phosphonat), -2.1 (d, $^3\text{J}(\text{P},\text{P}) = 25$ Hz, Phosphat, Diastereomer I), -2.7 (d, $^3\text{J}(\text{P},\text{P}) = 18$ Hz, Phosphat, Diastereomer II).

7.4.4.2 Synthese der Peptidsequenz **1.3b** ($\text{R} = \text{iPr}$), Vergleich von Kopplungsreagenzien

Die Sequenz wurde in 3 parallelen Ansätzen von je 28 μmol in zwei Abschnitten (Lys^{12} bis Asn^8 , Ser^6 bis Ala^1) automatisch synthetisiert (Abimed), die Aminosäuren wurden als Doppelkopplung für je 1 Stunde im vierfachen Überschuß mit TBTU gekoppelt. Die Aminosäure Fmoc-Appb(*iPr*₄)-OH wurde im dreifachen Überschuß nach folgenden Protokollen gekoppelt: 56 mg Aminosäure (84 μmol), 30 μl DIEA (168 μmol) und **a**) 12 mg HOAt + 13 μl Diisopropylcarbodiimid (DIC) bzw. **b**) 27 mg TBTU bzw. **c**) 32 mg HATU (je 84 μmol) wurden in 300 μl DMF gelöst und für 2 Stunden an den ersten Abschnitt gekoppelt. Dabei wurde die Lösung mit HOAt und DIC für 30 Minuten inkubiert, bevor sie zum Harz gegeben wurde. Nach einer Probespaltung mit TFA und Massenanalyse wurde die automatische Synthese des zweiten Abschnitts fortgesetzt. Die Peptide wurden einzeln mit 10 ml „Silan“ für 3 Stunden abgespalten, aufgearbeitet und mit präp. HPLC (C_{18} -Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) gereinigt. Es wurden 25 mg (HATU-Ansatz, 15.3 μmol , 55 % Ausbeute) bzw. 14 mg (HOAt-Ansatz, 8.6 μmol , 31 % Ausbeute) bzw. 18 mg (TBTU-Ansatz, 11.0 μmol , 39 % Ausbeute) Peptid **1.3b** erhalten.

7.4.5 Entschützung der Peptide 1.3

7.4.5.1 Entschützung der Sequenz 1.3a (R = Et)

Variante 1: HBr/AcOH

13 mg des Peptids **1.3a** (8.2 μmol) wurden mit 1 ml HBr (40 % in Eisessig) versetzt und nach 2 Stunden wurde von einer Probe ein Massenspektrum gemessen. Nach 4.5 Stunden wurde ein HPLC-Lauf durchgeführt, der außer einem Peak bei der Totzeit keine weiteren Peaks aufwies.

MALDI-MS: 805 (100 %, EGG-Appb-NV), 696 (40 %), 636 (60 %, Ac-NVFSK-NH₂)

Zur Überprüfung wurden 10 mg Appb(Et₄) **3a** (26 μmol) in 3 Tropfen Eisessig gelöst und mit 3 Tropfen HBr (40 % in Eisessig) versetzt. Nach 2 Stunden wurden 0.5 ml Wasser zugesetzt, die Lösung wurde eingeeengt und von dem Rückstand wurden ¹H- und ³¹P-NMR-Spektren gemessen. **¹H-NMR** (CDCl₃/DMSO-d₆, 300 MHz): 8.6 (br. t, 3 H, NH₃⁺), 5.9 (br. s, Wasser), 4.92 (m, 1 H, H-2), 4.18 (m, 9 H, H-4, H-5, H-7), 2.66 (m, 2 H, H-3), 1.31 (m, 12 H, H-6, H-8).

³¹P-NMR (CDCl₃/DMSO-d₆, 121 MHz): 21.7 (d, ³J(P,P) = 14 Hz, Phosphonat), 20.0 (d, ³J(P,P) = 21 Hz, Phosphonat), 19.6 (d, ³J(P,P) = 22 Hz, Phosphonat), 17.6 (d, ³J(P,P) = 23 Hz, Phosphonat), 0.0 (d, ³J(P,P) = 22 Hz, Phosphat), - 0.3 (d, ³J(P,P) = 23 Hz, Phosphat).

Variante 2: TFMSA/TFA

10 mg Appb(Et₄) **3a** (26 μmol) wurden in 300 μl TFA gelöst und mit 150 μl Thioanisol (1.2 mmol) und 50 μl TFMSA (550 μmol) versetzt. Nach 1 Stunde wurde die Lösung eingeeengt und der Rückstand in D₂O und CDCl₃ gelöst analysiert. In beiden Lösungsmitteln zeigte das Protonen-NMR-Spektrum neben den Signalen der Reagenzien auch die Signale der Ethylgruppen.

7.4.5.2 Entschützung der Sequenz 1.3b (R = *i*Pr)

Variante 1: TFMSA/TFA, siehe Tabelle 7.5

Im Vorversuch wurden 10 mg Appb(*i*Pr₄) **3b** (22 μmol) in 0.9 ml TFA gelöst und mit 0.1 ml TFMSA versetzt. Nach 2 Stunden wurden 2 ml Wasser zugegeben, und es wurde eingeeengt.

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz): 4.80 (LM), 4.64 (m, 1 H, H-2), 4.37 (m, 1 H, H-4), 2.62 (m, 1 H, H-3), 2.42 (m, 1 H, H-3).

Pro Ansatz wurden 1 mg des Peptids **1.3b** in 100 bis 300 µl der Abspalllösungen gelöst. Zur Massenanalyse wurden 0.5 µl entnommen und vermessen. Die Aufarbeitung erfolgte durch Zugabe von 300 - 500 µl Wasser oder 300 - 500 µl Methanol mit 100 - 250 µl DIEA, die Lösungen wurden eingeeengt. Die Reinigung erfolgte durch präp. HPLC (C₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA), die Identifizierung durch Maldi-MS (m/z 1368) oder Aminosäureanalyse. Aufgrund der geringen Peptidmenge konnte keine Ausbeute für einzelne Umsetzungen angegeben werden.

Tabelle 7.5: Abspaltung der Isopropylgruppen aus Peptid **1.3b**, Variante 1

Abspalllösung, als % in TFA	Zeit	Ergebnis	Aufarbeitung
TFMSA, 1	24 h	unvollständig entschützt (uv)	-
TFMSA, 5	2 h	uv, teilw. Absp. von H ₂ O (- H ₂ O)	-
	4 h	vollständig, teilw. - H ₂ O	H ₂ O, einengen
TFMSA, 10	1 h	uv, teilw. - H ₂ O	-
TFMSA/H ₂ O, 3/1	2 d	k. Reaktion	-
TFMSA/H ₂ O, 5/1	3 h	v, teilw. - H ₂ O	MeOH, DIEA, einengen
TFMSA/H ₂ O, 5/5	1.5 h	uv, Nebenreaktionen	H ₂ O, einengen
TFMSA/DMS, 1/3	2 h	uv, teilw. - H ₂ O	-
	1 d	v, teilw. - H ₂ O	einengen
TFMSA/DMS/m-Cresol, 20/10/10	2 d	k. Massen	-
TFMSA/TA, 1/3	1 h	uv, teilw. - H ₂ O	-
TFMSA/TA/H ₂ O, 5/5/5	4 d	uv, teilw. - H ₂ O	-

Variante 2: TMS-OTf/TFA, siehe Tabelle 7.6

Pro Ansatz wurden 1 mg des Peptids **1.3b** in 100 bis 300 µl der Abspalllösungen gelöst. Zur Massenanalyse wurden 0.5 µl entnommen und vermessen. Die Aufarbeitung erfolgte durch

Zugabe von 300 - 500 µl Wasser oder 300 - 500 µl Methanol mit 100 - 250 µl DIEA, die Lösungen wurden eingeeengt oder direkt in die präp. HPLC eingespritzt. Alternativ wurde die Lösung in *tert*-Butylmethylether eingetropft und das ausgefallene Peptid abzentrifugiert. Die Reinigung erfolgte durch präp. HPLC (C₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA), die Identifizierung durch Maldi-MS oder Aminosäureanalyse. Aufgrund der geringen Peptidmenge konnte keine Ausbeute für einzelne Umsetzungen angegeben werden.

Tabelle 7.6: Abspaltung der Isopropylgruppen aus Peptid **1.3b**, Variante 2

Abspalltlösung, als % in TFA	Zeit	Ergebnis	Aufarbeitung
TMS-OTf, 3	2 d	vollständig entschützt, teilw. Absp. von Wasser (- H ₂ O)	-
TMS-OTf, 5	0.5 h	uv, teilw. - H ₂ O	-
	1 h	vollständig, teilw. - H ₂ O	H ₂ O, einengen
TMS-OTf/DMS, 25/5	1 h	uv	-
	1.5 h	uv, teilw. - H ₂ O	-
TMS-OTf/TA, 20/10	1 h	v, teilw. - H ₂ O	-
TMS-OTf/TA/m-Cresol, 20/10/10	3 h	uv	MeOH, DIEA,
	ab 3 h	v, teilw. - H ₂ O	einengen

Variante 3: TMS-Br mit DMS in TFA

1 mg des Peptids **1.3b** wurden in 234 µl TFA gelöst und mit 17 µl DMS sowie 49 µl TMS-Br versetzt. Zur Massenanalyse wurden 0.5 µl entnommen und vermessen: Neben der unvollständigen Entschützung wurde Dehydratisierung des Peptids beobachtet.

Variante 4: TMS-Iodid in Acetonitril, harzgebundenes Peptid

50 mg Harz mit gebundenem, vollständig geschütztem Peptid **1.3b** (8.1 µmol) wurden in 1.5 ml Acetonitril suspendiert und mit 23 µl TMS-I (ca. 20facher Überschuß) versetzt. Nach 4 Stunden Reaktionszeit wurde das Harz abfiltriert und mit Acetonitril, Methanol, DMF und CH₂Cl₂ gewaschen, das Filtrat wurde eingeeengt und mit *tert*-Butylmethylether versetzt. Das Rohpeptid wurde abzentrifugiert, für 3 Stunden mit 5 ml „Silan“ behandelt und erneut ausgefällt. Das noch am Harz gebundene Peptid wurde mit 5 ml „Silan“ für 3 Stunden abgespalten und ebenfalls ausgefällt. Die Rohpeptide wurden vereinigt und mit präp. HPLC (C₈-Säule, Gradient P2, mit

0.5 % TFA) gereinigt. Bei einem ersten Ansatz wurden 5 mg reines, ungeschütztes Peptid **1.3** (3.06 μmol , 37 % Ausbeute) erhalten, bei einem zweiten Ansatz trat als Nebenreaktion eine teilweise Dehydratisierung auf. Die Umsetzung von 10 mg Harz mit einem zehnfachen Überschuß an TMS-I brachte in 4 Stunden keinen Erfolg, es konnte keine Schutzgruppenabspaltung beobachtet werden.

Aus den Entschützungsexperimenten konnten insgesamt 12.3 mg Peptid **1.3** gewonnen werden (9.0 μmol).

7.4.6 Synthese der Peptidsequenz 1.4a (Ac-A-A-E-G-G-S-Ahpb(*i*Pr₂)-N-V-F-S-K-NH₂), Vergleich von Kopplungsreagenzien

Die Sequenz wurde in 5 Ansätzen von 34 μmol , 38 μmol , 39 μmol , 43 μmol bzw. 45 μmol in zwei Abschnitten (Lys¹² bis Asn⁸ und Ser⁶ bis Ala¹) automatisch synthetisiert (Milligen). Die Aminosäuren wurden für je 30 Minuten im vierfachen Überschuß, die Aminosäure Fmoc-Ahpb(THP, *i*Pr₂)-OH im vierfachen Überschuß nach folgenden Protokollen gekoppelt:

- a) TBTU: 80 mg Aminosäure, 44 mg TBTU und 48 μl DIEA in 560 μl DMF für 2 h
- b) HATU: 90 mg Aminosäure, 58 mg HATU und 53 μl DIEA in 560 μl DMF für 2 h
- c) PyBOP: 90 mg Aminosäure, 80 mg PyBOP und 54 μl DIEA in 560 μl DMF für 2 h
- d) HOBt: 101 mg Aminosäure, 24 mg HOBt und 27 μl DIC in 610 μl DMF für 30 min voraktivieren, 2 h koppeln
- e) HOAt: 106 mg Aminosäure, 25 mg HOAt und 28 μl DIC in 630 μl DMF für 30 min voraktivieren, 2 h koppeln.

Nach Massenanalyse wurden die Harze nach Filtration und Waschen mit DMF vereinigt und automatisch weitersynthetisiert (Milligen, 200 μmol Ansatz). Von dem Rohharz wurden 81 mg zur Abspaltung der Phosphorschutzgruppen besonders behandelt (7.4.7, Var. 4), das restliche Harz wurde mit 10 ml „Silan“ für 3 Stunden behandelt. Nach Aufarbeitung und Reinigung mit präp. HPLC (C₁₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) wurden 42 mg Peptid **1.4a** (30.3 μmol , 23 % Ausbeute) erhalten. Als „Nebenprodukt“ (ca. 50 % des Rohpeptids) wurde die Teilsequenz Asn⁸-Lys¹² identifiziert.

7.4.7 Entschützung der Sequenz 1.4a

Variante 1: TFMSA/TFA

2 mg des Peptids **1.4a** (1.4 μmol) wurden in 500 μl TFA gelöst und mit je 5 μl TFMSA und Wasser versetzt. Nach 1 Stunde wurde eine HPLC-Messung durchgeführt, dabei traten zwei neue Peaks auf, die früher als das Edukt eluiert wurden. Der zweite (unpolarere) konnte durch Massenspektrometrie als einfach entschütztes Peptid identifiziert werden, der erste Peak enthielt mehrere Substanzen, die sich als die Bruchstücke Ac-Ala¹-Ahp⁷ (-H₂O) sowie Asn⁸-Lys¹² identifizieren ließen. Zur vollständigen Umsetzung der monogeschützten Substanz wurde die Reaktionszeit auf 3 Stunden verlängert, dies führte aber ebenfalls nur zu dem Gemisch der Fragmente.

Variante 2: HBr/AcOH

2 mg des Peptid **1.4a** (1.4 μmol) wurden in 1 ml Eisessig gelöst und mit 5 μl HBr (40 % in AcOH) versetzt. Nach 30 Minuten wurde eine Probe mit Massenspektrometrie analysiert, die auf ein komplexes Produktgemisch hinwies. Da eine verlängerte Reaktionszeit ebenfalls nur zu einer Spaltung des Peptids führte, wurde die Umsetzung abgebrochen.

Variante 3: TMS-OTf/TFA

8 mg des Peptids **1.4a** (5.8 μmol) wurden in 300 μl TFA gelöst und mit 100 μl TMS-OTf, 50 μl Thioanisol und 50 μl m-Cresol versetzt. Nach 2 Stunden wurde eine HPLC-Messung durchgeführt, die wie in Variante 1 das Auftreten des monogeschützten Peptids sowie des komplexen Produktgemischs zeigte. Zur Trennung wurde die Reaktionslösung mit 5 ml Methanol und 1.3 ml DIEA versetzt. Es wurde eingeeengt, der Rückstand mit *tert*-Butylmethylether gewaschen und mit präp. HPLC (C₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) getrennt. Von der ersten Fraktion wurde eine Aminosäureanalyse durchgeführt, die aber nicht die erwartete Zusammensetzung zeigte.

Variante 4: TMS-Iodid in Acetonitril, harzgebundenes Peptid

50 mg Harz mit gebundenem, vollständig geschütztem Peptid **1.4a** (8.3 μmol) wurden in 1 ml Acetonitril suspendiert und mit 29 μl TMS-I (ca. 20facher Überschuß) versetzt. Nach 4 Stunden Reaktionszeit wurde das Harz abfiltriert und mit Acetonitril, Methanol, DMF und CH₂Cl₂ gewaschen, die Filtrate wurden eingeeengt und mit *tert*-Butylmethylether versetzt. Das Rohpeptid

enthielt neben geringen Anteilen am diisopropylgeschützten Peptid auch ein Gemisch aus Bruchstücken mit dem C-terminale Fragment Asn⁸-Lys¹². Das noch am Harz gebundene Peptid wurde mit 3 ml „Silan“ für 3 Stunden abgespalten und nach Einengen ausgefällt. Dieses Peptidgemisch enthielt ebenfalls neben dem nicht umgesetzten Edukt das Fragment 8 bis 12.

Die Umsetzung von 31 mg Harz mit gebundenem Peptid **1.4a** unter einem zehnfachen Überschuß an TMS-I brachte in 4 Stunden keinen Erfolg, bei einer Probespaltung mit TFA konnte keine Schutzgruppenabspaltung beobachtet werden.

7.4.8 Synthese der Peptidsequenz **1.4** (Ac-A-A-E-G-G-S-Ahpb-N-V-F-S-K-NH₂)

Das Peptid wurde mit einer Ansatzgröße von 25 µmol in zwei Abschnitten (Lys¹² bis Asn⁸ und Ser⁶ bis Ala¹) automatisch synthetisiert (Abimed), die Aminosäuren wurden im vierfachen Überschuß für 60 Minuten gekoppelt. Ein Diastereomer der Ahpb⁷ wurde im zweifachen Überschuß manuell für 18 Stunden gekoppelt: 30 mg (50 µmol) Fmoc-Ahpb(MEM, *t*Bu₂), 16 mg TBTU (50 µmol) und 17 µl DIEA (100 µmol) wurden in 0.25 ml DMF gelöst und auf das Harz gegeben. Nach Abspaltung des Peptids mit 3 ml „Silan“ für 3 Stunden, Aufarbeitung und Reinigung mit präp. HPLC (C₁₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) wurden 4 mg des vollständig entschützten Peptids **1.4** (2.9 µmol, 12 % Ausbeute) erhalten.

7.5 Synthese der Peptidsequenz **2**

7.5.1 Synthese der unphosphorylierten Sequenz **2.0** (R-R-R-R-A-A-S-V-A-NH₂)

Die unphosphorylierte Sequenz wurde mit einer Ansatzgröße von 3 x 30 µmol automatisch synthetisiert (Abimed), die Aminosäuren wurden im vierfachen Überschuß für je 45 Minuten gekoppelt. Das Peptid wurde mit 10 ml „Silan“ für 3 Stunden abgespalten und mit präp. HPLC (C₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) gereinigt. Die Produktmenge betrug 65 mg (42.6 µmol, 47 % Ausbeute).

7.5.1 Synthese der Peptidsequenz 2.1 (R-R-R-R-A-A-S(P)-V-A-NH₂)

7.5.1.1 Synthese mit globaler Phosphorylierung

Das Peptid wurde mit einer Ansatzgröße von 50 µmol automatisch synthetisiert (Milligen), die Aminosäuren wurden im vierfachen Überschuß für 30 Minuten gekoppelt, wobei Ser⁷ ungeschützt eingesetzt wurde. Zur globalen Phosphorylierung wurde das Harz im Hochvakuum getrocknet, unter Argon mit 350 mg Tetrazol (5 mmol) und 1.25 ml Di-*tert*-butyl-N,N'-diethylphosphoramidit (5 mmol) in 2.5 ml DMF versetzt und 18 Stunden geschüttelt. Es wurden 3.9 ml *tert*-Butylhydroperoxid (80 % in Di-*tert*-butylperoxid) zugesetzt, wobei sich das Gemisch erwärmt, und nach weiteren 5 Stunden wurde das Harz abfiltriert und mit DMF gewaschen. Das Peptid wurde mit 5 ml „Silan“ für 3 Stunden abgespalten, aufgearbeitet und mit präp. HPLC (C₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) gereinigt. Es wurden 75 mg Phosphat-Peptid **2.1** (46.7 µmmol, 93 % Ausbeute) erhalten. 40 mg des Peptids wurden mit Gelfiltration (4 mg Peptid/Lauf) in die Acetatform überführt, dabei wurden 36 mg isoliert.

7.5.1.2 Synthese mit vorphosphoryliertem Baustein

Das Peptid wurde mit einer Ansatzgröße von 100 µmol manuell synthetisiert, die Aminosäuren wurden im vierfachen Überschuß für 2 Stunden gekoppelt. Die Abspaltung erfolgt mit 10 ml „Silan“ für 3 Stunden, nach Aufarbeitung und HPLC-Reinigung (C₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) wurden 46 mg Peptid **2.1** (28.6 µmmol, 29 % Ausbeute) erhalten.

7.5.1.3 Synthese der ³²P-markierten Peptidsequenz 2.1* durch enzymatische Phosphorylierung

Die enzymatische Phosphorylierung mit PKA erfolgt in folgendem Puffer: 100 mM MOPS, 400 mM NaCl, 2 mM Mg(OAc)₂, 0.8 mM EGTA und 2 mg/ml BSA. Die radioaktive ATP-Lösung wurde durch Mischen von 100 µl „kalter“ ATP-Lösung (10 mM) mit 10 µl „heißer“ ATP-Stammlösung erhalten. Von der „heißen“ Mischung wurde durch Scintilationsmessung in 2 ml Scintilationsflüssigkeit die spezifische Radioaktivität ermittelt ($2.57 \cdot 10^5$ cpm/nmol). Das

Peptid **2.0** wurde in Wasser zu einer Konzentration von 2 mM gelöst. 50 µl dieser Substratlösung wurden mit 100 µl Puffer verdünnt und mit 1 M Tris-Puffer auf pH 7.5 eingestellt. Es wurden 50 µl ATP-Lösung zugegeben (Gesamtkonzentration 2.25 mM), auf 30 °C temperiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl PKA-Lösung (2.4 µg Kinase, 14.4 mU) gestartet. Nach 3 Stunden wurde die Phosphorylierung mit 100 µl Eisessig gestoppt. Die Lösung wurde über 200 µl Anionenaustauscher (Acetatform) gegeben und mit 200 µl 30%iger Essigsäure gewaschen. Von dem Filtrat (~ 500 µl, 0.2 mM) wurde ebenfalls die Radioaktivität bestimmt. Der Phosphorylierungsgrad des Peptids **2.1*** betrug demnach 69 %.

7.5.2 Versuch zur Synthese der Peptidsequenz 2.2 (R-R-R-R-A-A-S(TP)-V-A-NH₂), Synthese mit globaler Thiophosphorylierung

Das Peptid wurde mit einer Ansatzgröße von 50 µmol automatisch synthetisiert (Milligen), die Aminosäuren wurden im vierfachen Überschuß für 40 Minuten gekoppelt, wobei Ser⁷ ungeschützt eingesetzt wurde. Zur globalen Thiophosphorylierung wurde das Harz im Hochvakuum getrocknet, unter Argon mit 350 mg Tetrazol (5 mmol) und 1.25 ml Di-*tert*-butyl-N,N'-diethylphosphoramidit (5 mmol) in 2.5 ml DMF versetzt, 18 h geschüttelt, anschließend abfiltriert und mit Acetonitril gewaschen. Die Einführung des Schwefels erfolgt in einem Plastikgefäß durch Zugabe von 50 mg 3*H*-1,2-Benzodithiol-3-one-1,1-dioxid (250 µmol) zur Suspension des Harzes in 5 ml Acetonitril. Nach 5 Stunden wurde filtriert und das Harz wurde mit 100 ml 10%iger Natriumpyrosulfitlösung und Methanol gewaschen. Das Peptid wurde mit 5 ml „Silan“ für 3 Stunden abgespalten, aufgearbeitet und mit präp. HPLC (C₈-Säule, Gradient P2, mit 0.5 % TFA) gereinigt. Als Hauptprodukt wurde das Phosphat-Peptid isoliert, das Thiophosphat konnte nicht nachgewiesen werden.

7.5.3 Synthese der Peptidsequenz 2.3 (R-R-R-R-A-A-Ahpb(*i*Pr₂)-V-A-NH₂)

Das Peptid wurde mit einer Ansatzgröße von 30 µmol manuell synthetisiert. Das Appb-Derivat wurde im dreifachen Überschuß gekoppelt: 53 mg (90 µmol) Fmoc-Ahpb(*i*Pr₂, THP), 29 mg TBTU (90 µmol) und 31 µl DIEA (180 µmol) in 0.7 ml DMF über 20 Stunden, alle anderen Aminosäuren im vierfachen Überschuß für 2 Stunden. Für die Isolierung des Peptids wurde das

Harz mit 3 ml „Silan“ für 4 Stunden behandelt, das Peptid aufgearbeitet und mit präp. HPLC (C₈-Säule, Gradient P2) gereinigt. Es wurden 13 mg Produkt **2.3** (7.6 µmol, 25 % Ausbeute) erhalten.

7.6 Kinetische Untersuchungen

7.6.1 Dephosphorylierung des Phosphopeptids **1.1** mit der alkalischen Phosphatase bei verschiedenen pH-Werten

Die Dephosphorylierung wurde bei pH-Werten von 6.5 bis 8.5 in Schritten von 0.5 pH-Einheiten durchgeführt.

Der verwendete Puffer bestand aus folgenden Bestandteilen: 0.1 mM Tris, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂ sowie 1 mg/ml BSA, die in Millipore-Wasser gelöst wurden. Das Peptid **1.1** wurde in dem Puffer zu einer Stammlösung der Konzentration 20 mM unter Erwärmen gelöst, die alkalische Phosphatase wurde mit Wasser auf 200 U/ml (entspr. 85 µg/ml bzw. 0.85 µM) verdünnt. Die Stammlösung wurde mit Puffer auf eine Peptidkonzentration von 3 mM in 50 µl Ansatz verdünnt, mit HCl (1 M) auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und auf 30 °C temperiert. Durch Zugabe von 1 µl Phosphataselösung (entspr. 0.2 U bzw. 85 ng) wurde die Reaktion gestartet, vor Zugabe und nach 30 Minuten wurden 17.5 µl entnommen und zum Abstoppen mit 17.5 µl HCl (1 M) versetzt. Von der Stopplösung wurde wie unter 7.1 beschrieben der Phosphatgehalt ermittelt.

Tabelle 7.7: Dephosphorylierung bei verschiedenen pH-Werten

pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
Menge Phosphat	1.00 nmol	1.05 nmol	1.11 nmol	0.59 nmol	0.21 nmol

7.6.2 Dephosphorylierung des Phosphopeptids **1.1** mit der alkalischen Phosphatase

Der unter 7.6.1 beschriebene TRIS-Puffer wurde mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt. Die alkalische Phosphatase wurde mit diesem Puffer auf eine Konzentration von

200 U/ml (entspr. 85 µg/ml bzw. 0.85 µM) verdünnt, das Peptid **1.1** in dem Puffer zu einer Stammlösung der Konzentration 20 mM unter Erwärmen gelöst und mit 1 M Tris in Wasser auf pH 7.5 eingestellt. Das Substrat wurde mit Puffer auf die folgenden Konzentrationen verdünnt: 20, 10, 6, 3.5, 2 und 1 mM, die Ansatzgröße betrug 87.5 µl. Nach Temperierung auf 30 °C wurde durch Zugabe von 10 µl Enzymlösung (entspr. 2 U bzw. 0.85 µg bzw. 100 nM) die Reaktion gestartet. Vor der Zugabe sowie nach 1, 2, 3 und 5 Minuten wurden 17.5 µl entnommen und zum Abstoppen mit dem gleichen Volumen an 1 M HCl gemischt. Von den Stopp-lösungen wurde wie unter 7.1 beschrieben die freigesetzte Phosphatmenge bestimmt und durch Interpolation in den ersten 2 bis 3 Minuten die Anfangsgeschwindigkeit ermittelt.

Tabelle 7.8: Dephosphorylierungsgeschwindigkeit des Phosphopeptids **1.1**

[S] in mM	20	10	6	3.5	2	1	0.5
v in µmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	1.46	1.45	1.35	1.20	0.98	0.63	0.40

7.6.3 Dephosphorylierung des Phosphat-Phosphonat-Peptids **1.3** mit der alkalischen Phosphatase

Die Umsetzung des Phosphat-Phosphonat-Peptids **1.3** als Substrat erfolgte unter identischen Bedingungen wie bei dem Phosphopeptid.

Tabelle 7.9: Dephosphorylierungsgeschwindigkeit des Phosphat-Phosphonat-Peptids **1.3**

[S] in mM	20	10	6	3.5	2	1
v in µmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	0.52	0.52	0.43	0.33	0.16	0.034

7.6.4 Dephosphorylierung des Phosphopeptids **2.1** mit der Proteinphosphatase 2A

Der verwendete Puffer enthielt folgende Bestandteile: 50 mM Imidazol, 14 mM β-Mercaptoethanol, 10 mg/ml Protaminsulfat, 1 mM EDTA, 2 mg/ml BSA sowie 10 % Glycerin, die in Millipore-Wasser gelöst wurden. Der pH-Wert wurde mit HCl (1 M) auf 7.3 eingestellt. Das HPLC-gereinigte, „kalte“ Phosphopeptid **2.1** wurde in dem Puffer gelöst, die Konzentration der Substrat-Stammlösung betrug 25 mM. Die Proteinphosphatase 2A wurde mit Puffer auf 2 U/ml

verdünnt (entspr. 1.54 µg/ml bzw. 16 nM), das „heiße“ Peptid **2.1*** wurde im Phosphorylierungspuffer eingesetzt. Das Experiment wurde bei Substratkonzentrationen von 2 mM bzw. 20 µM durchgeführt, die Konzentration an „heißem“ Peptid betrug jeweils 20 µmol. Die Ansätze von je 65 µl wurden auf 30 °C temperiert, es wurden zweimal 5 µl Probe als Nullwerte entnommen und auf ein 1 x 1 cm großes Phosphocellulose-Papier getüpfelt, das Papier wurde sofort in Phosphorsäure (75 mM) gegeben. Durch Zugabe von 5 µl PP 2A (entspr. 10 mU bzw. 7.7 ng bzw. 1.33 nM) wurde die Reaktion gestartet, und nach 1, 2, 3, 5, 10, 30 und 60 Minuten wurden weitere Proben entnommen, getüpfelt und in Phosphorsäure gegeben. Der Überstand der Papiere wurde verworfen, und die Papiere wurden zweimal mit Phosphorsäure und einmal mit Ethanol gewaschen. Nach Trocknung wurde die Radioaktivität durch Messung der Papierstücke in 2 ml Scintillationsflüssigkeit ermittelt. Bei zwei Wiederholungen des Experimentes wurden einmal das durch Gelfiltration gereinigte Peptid **2.1** verwendet, einmal die zehnfache Menge des Enzyms (0.1 U bzw. 77 ng) eingesetzt.

Als Test der Nachweismethode wurde das Experiment bei der Substratkonzentration von 2 mM wiederholt. Die Proben wurden mit 240 µl Isobutanol/Toluol (1:1) und 160 µl einer 5 mM Lösung von Silicium-Wolframat in H₂SO₄ (1 mM) versetzt, kurz gemischt und nach Zugabe von 32 µl einer 5%igen Lösung von Ammoniummolybdat in H₂SO₄ (2 M) gründlich durchmischt. Nach Zentrifugation wurden 100 µl der organischen bzw. der wässrigen Phase in 2 ml Scintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktivität wurde bestimmt. Der größte Teil verblieb in der wässrigen Phase, es wurde nur wenig Radioaktivität extrahiert. Als Kontrolle wurde radioaktive Phosphorsäure der Konzentration 2 mM der Extraktionsprozedur unterworfen und konnte quantitativ extrahiert werden.

Ein weiterer Test zur Phosphatbestimmung erfolgte unter identischen Bedingungen mit „kaltem“ Substrat und der unter 7.1 beschriebenen colorimetrischen Methode.

7.6.5 Inhibition der Dephosphorylierung des Peptids 1.1 mit der Alkalischen Phosphatase durch Hydroxyphosphonat

Die Umsetzung des Phosphopeptids **1.1** als Substrat in Anwesenheit des Hydroxyphosphonat-Peptids **1.4** erfolgte unter identischen Bedingungen wie in Kapitel 7.6.2 angegeben, mit folgen-

den Abweichungen: die höchste Substratkonzentration betrug 17 mM und zu dem Substrat wurde eine Lösung des Hydroxyphosphonat-Peptids **1.4** (15 mM in Puffer) zugesetzt, so daß die Inhibitorkonzentration im Ansatz 0.3 mM, 0.6 mM bzw. 1.0 mM betrug. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 10 µl Enzymlösung (entspr. 0.85 µg bzw. 8.5 pmol bzw. 100 nM) gestartet, die Probennahme vor Zugabe und nach 1, 2, 3 und 5 Minuten sowie die Geschwindigkeitsbestimmung verliefen analog zu Kapitel 7.6.2. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 7.10 zusammengefaßt.

Tabelle 7.10: Inhibierung der Dephosphorylierung von Peptid **1.1** durch Peptid **1.4**

Inhibitorkonzentration	Substratkonzentration					
	17 mM	10 mM	6 mM	3.5 mM	2 mM	1 mM
0.0 mM	1.46 (20 mM)	1.45	1.35	1.20	0.98	0.63
0.3 mM	1.42	1.22	1.26	1.09		0.449
0.6 mM	1.34	1.08	0.946	0.773	0.739	0.491
1.0 mM		1.01	0.924	0.780	0.434	0.467

Literaturverzeichnis

Aaronson, S. A., *Science*, **1991**, 254, 1146 - 1153.

Agostinis, P., Goris, J., Pinna, L. A., Marchiori, F., Perich, J. W., Meyer, H. E. und Merlevede, W., *Eur. J. Biochem.*, **1990**, 189, 235 - 241.

Agostinis, P., Goris, J., Waelkens, E., Pinna, L. A., Marchiori, F. und Merlevede, W., *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262 (3), 1060 - 1064.

Ainslie, R. E., Schill, J. R. und Neet, K. E., *J. Biol. Chem.*, **1972**, 247, 7088 - 7096.

Amick, G. D., Reddy, S. A. G. und Damuni, Z., *Biochem. J.*, **1992**, 287, 1019 - 1022.

Angell, Y. M., Garcia-Echeverria, C. und Rich, D. H., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35 (33), 5981 - 5984.

Atherton, E., Logan, C. J. und Sheppard, R. C., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1981**, 538.

Bannwarth, W. und Trzeciak, A., *Helv. Chim. Acta*, **1987**, 70, 175 - 186.

Barford, D., Flint, A. J. und Tonks, N. K., *Science*, **1994**, 263, 1397 - 1404.

Bergmann, M. und Zervas, L., *Chem. Ber.*, **1932**, 65, 1192 - 1201.

Berkowitz, D. B., Shen, Q. und Maeng, J., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 6445 - 6448.

Bisswanger, H., *Theorie und Methoden der Enzymkinetik*, Verlag Chemie, Weinheim, **1979**.

Bodanszki, A., Bodanszki, M., Chandramouli, N., Kwei, J. Z., Martinez, J. und Tolle, J. C., *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 72 - 76.

Bodanszki, M., *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Heidelberg, **1993**.

Boissonnas, R. A., *Helv. Chim. Acta*, **1951**, 34, 874.

Bolin, D. R., Sytwu, I., Humiec, F. und Meienhofer, J., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1989**, 33, 353 - 359.

Briggs, G. E. und Haldane, J. B. S., *Biochem. J.*, **1925**, 19, 338 - 339.

Carpino, L. A. und Han, G. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 5748.

Castro, B., Dormoy, J. R., Evin, G. und Selve, C., *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 14, 1219 - 1222.

Chalvardjian, A. und Rudnicki, E., *Anal. Biochem.*, **1970**, 36, 225 - 226.

Chappelet-Tordo, D., Fosset, M., Iwatsubo, M., Gache, C. und Lazdunski, M., *Biochemistry*, **1974**, 13 (9), 1788 - 1795.

Chen, L., Wu, L., Otaka, A., Smyth, M. S., Roller, P. P., Burke, T. R. j., den Hertog, J. und Zhang, Z.-Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, 216 (3), 976 - 984.

Cohen, P., *Annu. Rev. Biochem.*, **1989**, 58, 453 - 508.

Corey, in *The logic of chemical synthesis*, Wiley Interscience, New York, **1989**, 436.

Curtius, T., *Chem. Ber.*, **1902**, 35, 3226.

Cushman, M., Chinnasamy, P., Chakraborti, A. K., Jurayj, J., Geahlen, R. L. und Haugwitz, R. D., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1990**, 36, 538 - 543.

Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T. W. und Barford, D., *EMBO Journal*, **1996**, 15, (24), 6798 - 6809.

Dixon, M., *Biochem. J.*, **1953**, 55, 170 - 171.

Domchek, S. M., Auger, K. R., Chatterjee, S., Burke, T. R. j. und Shoelson, S. E., *Biochemistry*, **1992**, 31, 9865 - 9870.

du Vigneaud, V., Ressler, C., Swann, J. M., Roberts, C. W., Katsoyannis, P. G. und Gordon, s., *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 4879 - 4880.

Eadie, G. S., *J. Biol. Chem.*, **1942**, 146, 85 - 93.

Fedde, K. N., Lane, C. C. und Whyte, M. P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1988**, 264 (2), 400 - 409.

Fernley, H. N. und Walker, P. G., *Biochem. J.*, **1967**, 104, 1011 - 1018.

Fields, G. B. und Noble, R. L., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1990**, 35, 161 - 214.

Fischer, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges*, **1902**, 35, 1095 - 1106.

Fischer, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges*, **1903**, 36, 2094 - 2106.

Fretz, H., *Lett. Pept. Sci.*, **1996**, 3, 343 - 348.

Garcia-Echeverria, C., *Lett. Pept. Sci.*, **1995**, 2, 369 - 373.

Garcia-Echeverria, C., *Lett. Pept. Sci.*, **1995**, 2, 93 - 98.

Green, O. M., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 44, 8081 - 8084.

Hanes, C. S., *Biochem. J.*, **1932**, 1406 - 1421.

Hardie, D. G., *Protein Phosphorylation*, Oxford University Press, Oxford, **1993**.

Hunter, T., *Cell*, **1995**, 80, 225 - 236.

Hunter, T. et al., *Targets for Signal-Transducing Protein Kinases*, Cold Spring Harbour Laboratories, Cold Spring Harbour, **1988**.

Iyer, R. P., Egan, W., Regan, J. B. und Beaucage, S. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1253 - 1254.

Jia, Z., *Biochem. Cell Biol.*, **1997**, 75, 17 - 26.

Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. und Cook, P. J., *Anal. Biochem.*, **1970**, 84, 595.

Kim, M. H., Lai, J. H. und Hangauer, D. G., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1994**, 44, 457 - 465.

Kitas, E. A. und Bannwarth, W., in *Peptides 1992*, C. H. Schneider, A. N. Eberle, ESCOM Science Publishers, Leiden, **1992**, 345.

Kitas, E. A., Perich, J. W., Johns, R. B. und Tregear, G. W., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 3591 - 3592.

Kitas, E. A., Perich, J. W., Tregear, G. W. und Johns, R. B., *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 4181 - 4187.

Kitas, E. A., Perich, J. W., Wade, J. D., Johns, R. B. und Tregear, G. W., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 6229 - 6232.

Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W. und Gillessen, D., in *Peptides 1990*, E. Giralt und D. Andreu, ESCOM Science Publishers, Leiden, **1991**, 62 - 64.

Kocienski, P., *Protection groups*, Thieme Verlag, Stuttgart, **1994**.

Kokotos, G., *Synthesis*, **1990**, 299 - 301.

Kole, H. K., Smyth, M. S., Russ, P. L. und Burke, T. R. j., *Biochem. J.*, **1995**, 311, 1025 - 1031.

König, W. und Geiger, R., *Chem. Ber.*, **1973**, 106, 3626 - 3635.

Krchnak, V., Vagner, J. und Lebl, M., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1988**, 32, 415.

Krebs, E. G. und Fischer, E. H., *Angew. Chem.*, **1993**, 105, 1173 - 1188.

Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S. und Candia, O. A., *Anal. Biochem.*, **1979**, 100, 95 - 97.

Lebl, M., Stierandova, A., Eichler, J. und Bienert, M., in *Peptides 1990*, E. Giralt und D. Andreu, ESCOM Science Publishers, Leiden, **1991**, 153 - 155.

Liberek, B., *Chem. Ind.*, **1961**, 987 - 989.

Martin, J. B. und Doty, D. M., *Anal. Chem.*, **1949**, 21 (8), 965 - 967.

Mc Kay, F. C. und Albertson, N. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 4686.

McGowan, C. H. und Cohen, P., *Eur. J. Biochem.*, **1987**, 166, 713 - 722.

Mergler, M., Nyfelder, R., Costelli, J. und Tanner, R., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 6741 - 6748.

Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149 - 2154.

Merrifield, R. B., *Angew. Chem.*, **1986**, 97, (10), 801 - 812.

Michaelis, L. und Menten, M., *Biochem. Z.*, **1913**, 49, 333 - 369.

Michnoff, C. H., Kemp, B. E. und Stull, J. T., *J. Biol. Chem.*, **1986**, 261, (18), 8320 - 8326.

Mitchell, A. G., Thomson, W., Nichols, D., Irwin, W. J. und Freemann, S., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1992**, 2345 - 2353.

- Miyashita, M., Yoshikoshi, A. und Grieco, P. A., *J. Org. Chem.*, **1977**, 42(23), 3772 - 3774.
- Mumby, M. C. und Walter, G., *Physiol. Rev.*, **1993**, 73, 673 - 699.
- Myers, J. K. und Widlanski, T. S., *Science*, **1993**, 262, 1451 - 1453.
- Nishiushi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bódi, J., Tsuji, F. I., Kimura, T. und Sakakibara, S., *Proceedings of the 25th European Peptide Symposium*, Budapest, **1998**, Wiley, Vortrag 14.
- Olah, G. A., Narang, S. C., Balaram Gupta, B. G. und Malhotra, R., *J. Org. Chem.*, **1979**, 44 (8), 1247 - 1251.
- Otaka, A., Miyoshi, K., Burke, T. R. j., Roller, P. P., Kubota, H., Tamamura, H. und Fujii, N., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 927 - 930.
- Ottinger, E. A., Shekels, L. L., Bernlohr, D. A. und Barany, G., *Biochemistry*, **1993**, 32, 4354 - 4361.
- Patel, D. V., Rielly-Gauvin, K. und Ryono, D. E., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31 (39), 5587 - 5590.
- Pato, M. D. und Adelstein, R. S., *J. Biol. Chem.*, **1980**, 255(14), 6535 - 6538.
- Perich, J. W., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1994**, 44, 288 - 294.
- Perich, J. W. und Reynolds, E. C., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1991**, 37, 572 - 575.
- Pope, B. M., Yamamoto, Y. und Tarbell, D. S., *Org. Synth. Coll. Vol. VI*, **1988**, 418.
- Pudovik, A. N., Gur'yanova, I. V. und Zimin, M. G., *Zh. Obshh. Khim.*, **1967**, 37 (9), 2088 - 2092.
- Rao, M. V., Reese, C. B. und Zhengyun, Z., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33 (33), 4839 - 4842.

Rapp, W., Zhang, L., Häbich, R. und Bayer, E., in *Peptides 1988*, G. Jung und E. Bayer, W. de Gruyter, Tübingen, **1988**, 199.

Reid, T. W. und Wilson, I. B., in *The Enzymes*, P. D. Boyer, 4, **1971**, 373 - 415.

Renil, M. und Pillai, V. N. R., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35 (22), 3809 - 3812.

Rink, H., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 3787.

Rodriguez, M., Llinares, M., Doulut, S., Heitz, A. und Martinez, J., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32 (7), 923 - 926.

Ruzza, P., Donella-Deana, A., Calderan, A., Pavanetto, M., Cesaro, L., Pinna, L. A. und Borin, G., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1995**, 46, 535 - 546.

Rylander, P. N., in *Catalytic Hydrogenations over Platinum-Metalls*, Academic Press, New York, **1967**, 464.

Salomon, C. J. und Breuer, E., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36 (37), 6759 - 6760.

Saperstein, R., Vicario, P. P., Strout, H. V., Brady, E., Slater, E. E., Greenlee, W. J., Ondeyka, D. L., Patchett, A. A. und Hangauer, D. G., *Biochemistry*, **1989**, 28, 5694 - 5701.

Schomburg, D. und Salzmann, M., in *Enzyme Handbook (Class 3: Hydrolases)*, D. Schomburg und M. Salzmann, Springer-Verlag, Berlin, 3, **1991**, 1-10.

Schultz, C., Vajanaphanich, M., Harootunian, A. T., Sammak, P. J., Barrett, K. E. und Tsien, R. Y., *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268 (9), 6316 - 6322.

Sefton, B. M., Hunter, T., Beemon, K. und Eckhart, W., *Cell*, **1980**, 20, 807 - 816.

Shapiro, G., Buechler, D., Enz, A. und Pombo-Villar, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 1173 - 1176.

Smyth, M. S., Ford, H. j. und Burke, T. R. j., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 4137 - 4140.

Stinson, R. A. und Chan, J. R. A., *Adv. Prot. Phosphatases*, **1987**, 4, 127 - 151.

Talbo, G., Wade, J. D., Dawson, N., Manoussios, M. und Tregear, G. W., *Lett. Pept. Sci.*, **1997**, 4, 121 - 127.

Tegge, W., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1994**, 43, 448 - 453.

Tegge, W. und Frank, R., *J. Peptide Res.*, **1997**, 49, 355 - 362.

Tong, G., Perich, J. W. und Johns, R. B., *Aust. J. Chem.*, **1992**, 45, 1225 - 1240.

Torriani, A., *Methods Enzymol.*, **1968**, 12, 212 - 218.

Ullrich, A. und Schlessinger, J., *Cell*, **1991**, 61, 203.

Valerio, R. M., Alewood, P. F., Johns, R. B., *Synthesis*, **1988**, 786 - 789.

Valerio, R. M., Perich, J. W., Kitas, E. A., Alewood, P. F. und Johns, R. B., *Aust. J. Chem.*, **1989**, 42, 1519 - 1525.

Waelkens, E., Goris, J., Di Salvo, J. und Merlevede, W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, 120 (2), 397 - 404.

Waelkens, E., Goris, J. und Merlevede, W., *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262 (3), 1049 - 1059.

Wakamiya, *Chem. Letters*, **1994**, 1099.

Walker, D. M., McDonald, J. F., Franz, J. E. und Logusch, E. W., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1990**, 659 - 666.

Wieland, T. und Bernhard, H., *Liebigs Ann. Chem.*, **1951**, 572.

Wiemann, A., *Diplomarbeit*, Technische Universität Braunschweig, **1995**.

Wrobel, J. und Dietrich, A., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 3543 - 3546.

Xu, Q., Ottinger, E. A., Solé, N. A. und Barany, G., *Lett. Pept. Sci.*, **1996**, 3, 333 - 342.

Yang, C., Qamar, R., Norton, S. J. und Cook, P. F., *Tetrahedron*, **1994**, 50, 1919 - 1926.

Yarden, Y. und Ullrich, A., *Annu. Rev. Biochem.*, **1988**, 57, 443.

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Hinweise zur Nomenklatur:

Die Abkürzungen für proteinogene Aminosäuren und deren Derivate richten sich nach den Regeln der IUPAC (*J. Biol. Chem.*, **1972**, 247, 977 - 983). Danach werden die Schutzgruppen des N-Terminus (x) der Aminosäure (Aaa) mit einem Bindestrich vorangestellt, die der Seitenketten (y) in Klammern direkt nachgestellt und die des C-Terminus (z) mit einem Bindestrich nachgestellt: x-Aaa(y)-z.

Die Abkürzungen für systematische Namen wurden in vorliegender Arbeit so gewählt, daß alle funktionellen Gruppen in der Abkürzung vorhanden waren (s. Ahpb/Appb, unten). Mehrere Seitenkettenschutzgruppen in einer Aminosäure wurden nach der Reihenfolge der geschützten Gruppen im Namen sortiert.

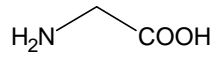
Für die Aminosäuren Ahpb bzw. Appb (s. u.) wurden die Kurzbezeichnungen Hydroxyphosphonat bzw. Phosphatphosphonat verwendet, um die Bezeichnung auf die in der vorliegenden Arbeit entscheidenden funktionellen Gruppen zu reduzieren.

Abkürzungen:

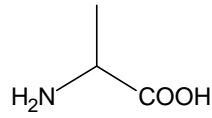
Ac	Acetyl-
AcOH	Essigsäure
ADP	Adenosindiphosphat
Ahpb	2-Amino-4-hydroxy-4-phosphono-buttersäure
Appb	2-Amino-4-phosphato-4-phosphono-buttersäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	absorption unit, „optische Dichte“
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl-
Bzl	Benzyl-
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
cHex	Cyclohexan

Ci	Curie
COSY	Korrelations-Spektroskopie
cpm	counts per minute, Zerfälle pro Minute
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DHP	2 <i>H</i> -3,4-Dihydropyran
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Ethylacetat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
Et	Ethyl-
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
kat	Katal, Einheit mol/s
K _i	inhibitorische Konstante
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
LM	Lösungsmittel
M	molar, Einheit mol/l
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
MEM	Methoxyethoxymethyl-
MeOH	Methanol
min	Minute
MLC	Myosin Light Chain
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie

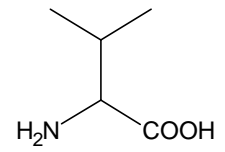
N	normal
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PP	Proteinphosphatase
ppm	parts per million, chemische Verschiebung in der NMR-Spektroskopie
<i>i</i> Pr	Isopropyl-
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat
S(P), Ser(P)	Phosphoserin
S(TP), Ser(TP)	Thiophosphoserin
Suc	Succinimid
TA	Thioanisol
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TMS	Trimethylsilyl-
TMS-OTf	Trimethylsilyl-triflat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Trt	Trityl-
pTsOH	p-Toluolsulfonsäure
U	unit, Einheit $\mu\text{mol}/\text{min}$
V_{max}	maximale Geschwindigkeit
Z	Benzyloxycarbonyl-

Anhang 1: Proteinogene Aminosäuren

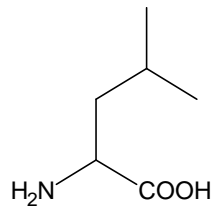
Glycin, Gly, G, unpolar



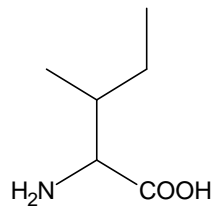
Alanin, Ala, A, unpolar



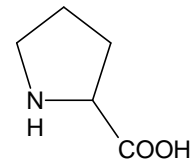
Valin, Val, V, unpolar



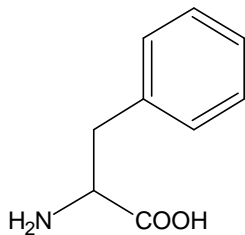
Leucin, Leu, L, unpolar



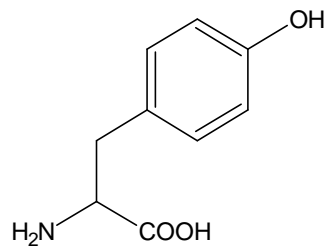
Isoleucin, Ile, I, unpolar



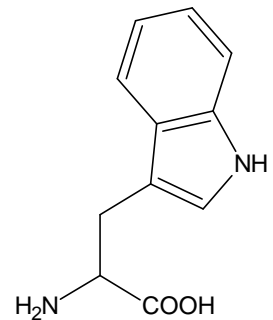
Prolin, Pro, P, unpolar



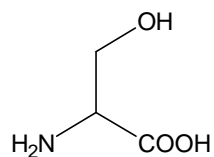
Phenylalanin, Phe, F, aromatisch



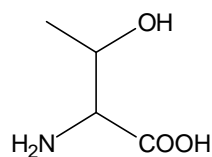
Tyrosin, Tyr, Y, aromatisch



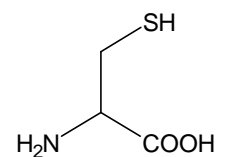
Tryptophan, Trp, W, aromatisch



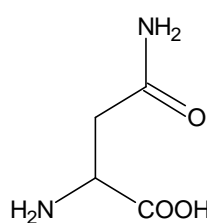
Serin, Ser, S, polar



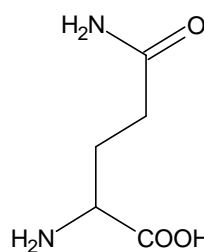
Threonin, Thr, T, polar



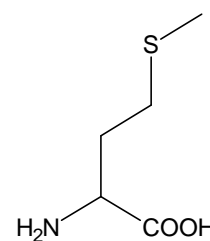
Cystein, Cys, C, polar



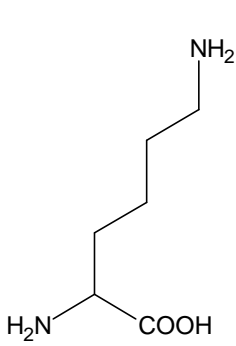
Asparagin, Asn, N, polar



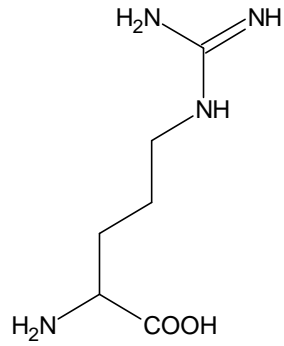
Glutamin, Gln, Q, polar



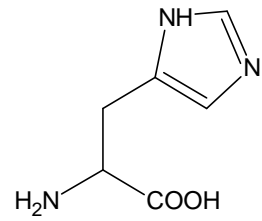
Methionin, Met, M, polar



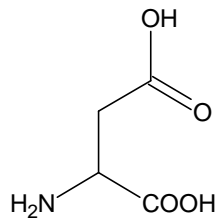
Lysin, Lys, K, basisch



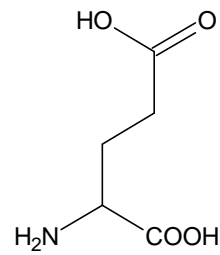
Arginin, Arg, R, basisch



Histidin, His, H, basisch

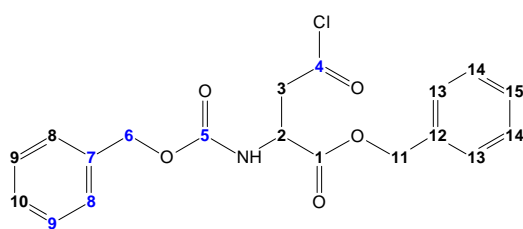


Asparaginsäure, Asp, D, sauer

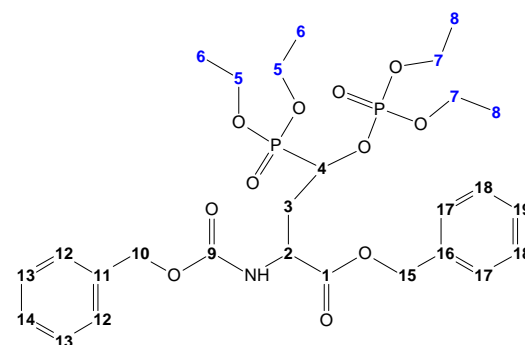
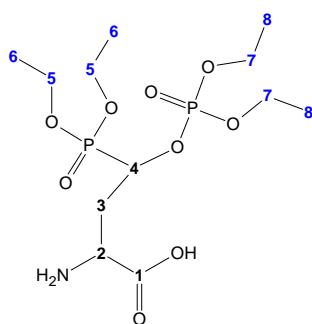
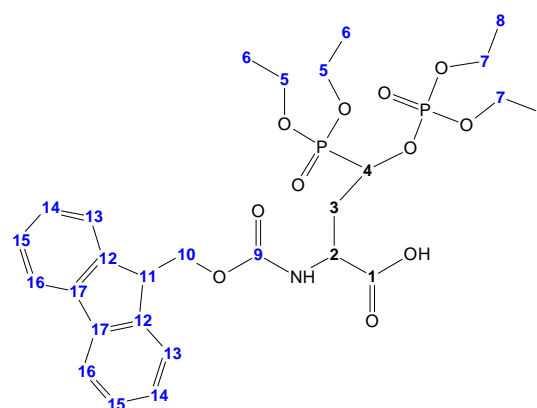
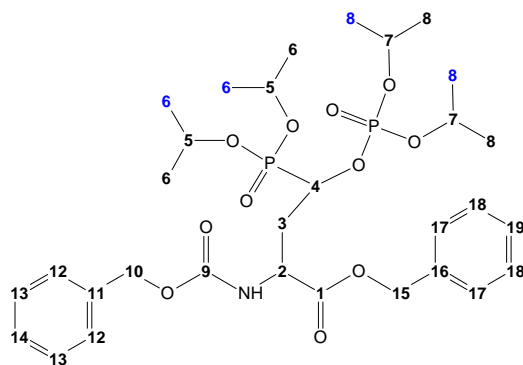
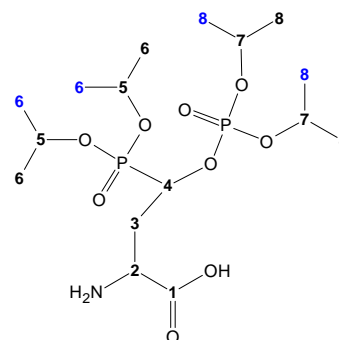
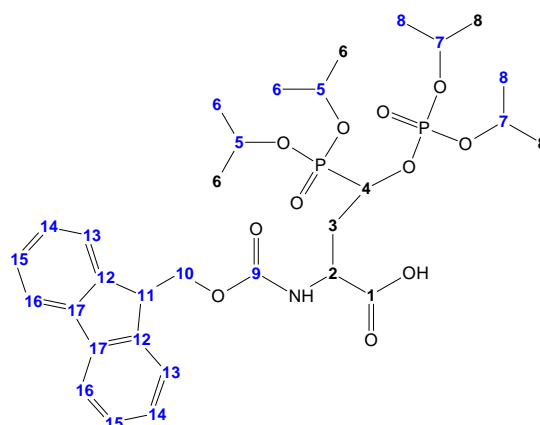


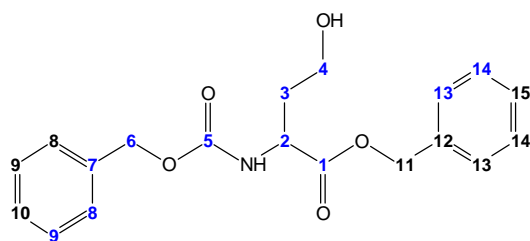
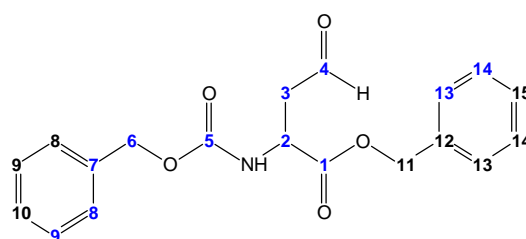
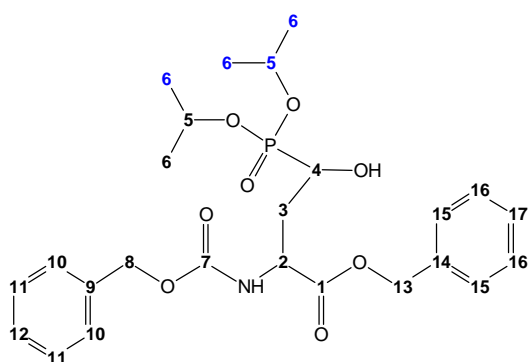
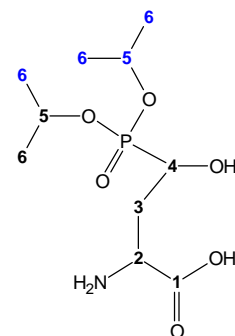
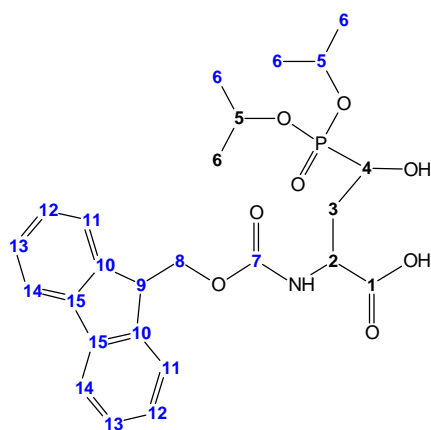
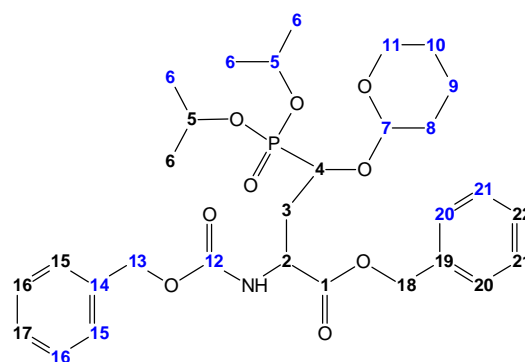
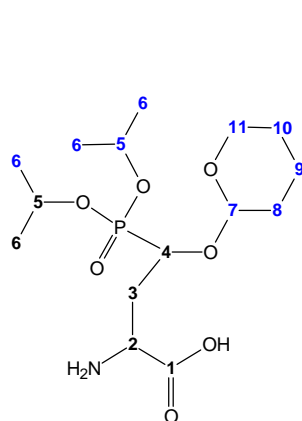
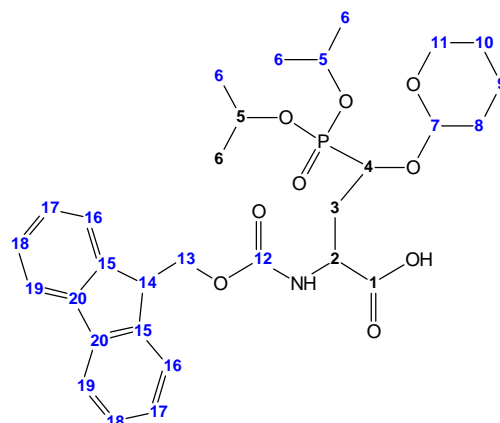
Glutaminsäure, Glu, E, sauer

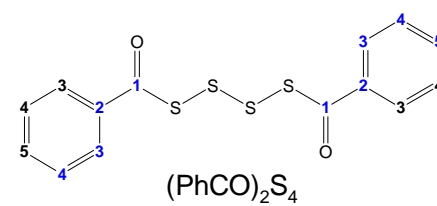
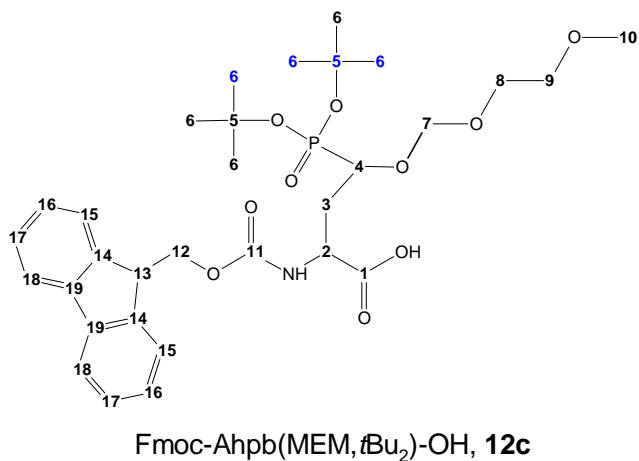
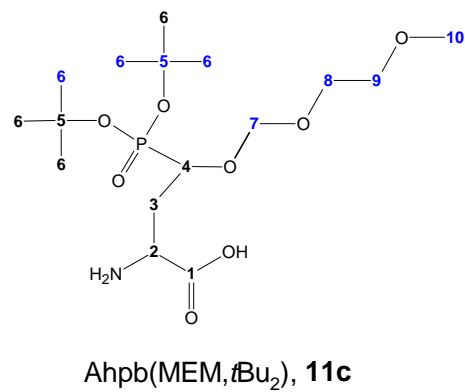
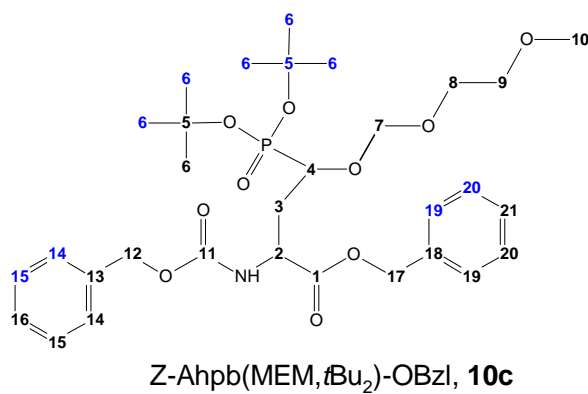
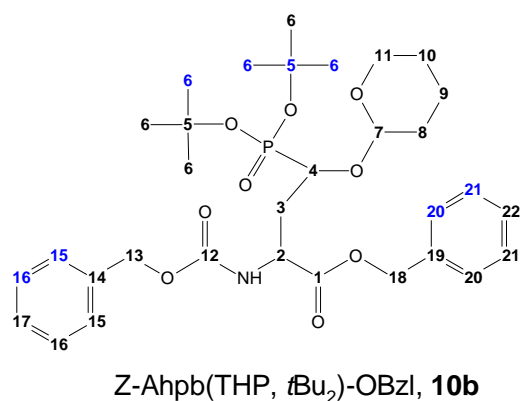
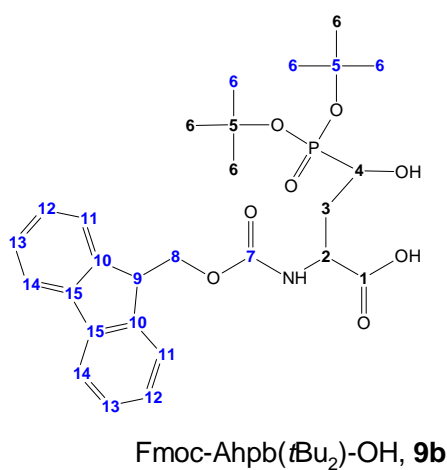
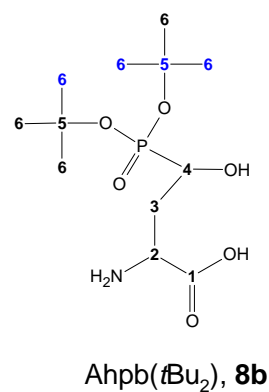
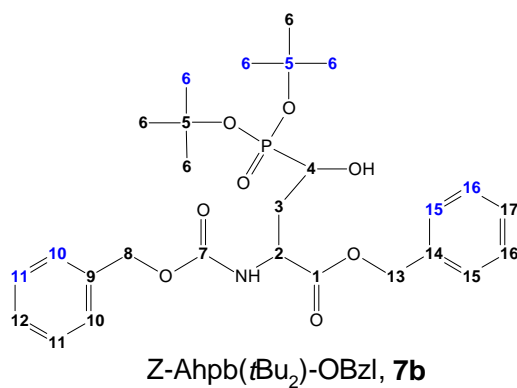
Anhang 2: NMR-Numerierung der Substanzen



Z-Asp(Cl)-OBzl, 1

Z-Appb(Et₄)-OBzl, 2aAppb(Et₄), 3aFmoc-Appb(Et₄)-OH, 4aZ-Appb(*i*Pr₄)-OBzl, 2bAppb(*i*Pr₄), 3bFmoc-Appb(*i*Pr₄)-OH, 4b

Z-Hse-OBzl, **5**Z-Asa-OBzl, **6**Z-Ahpb(*i*Pr₂)-OBzl, **7a**Ahpb(*i*Pr₂), **8a**Fmoc-Ahpb(*i*Pr₂)-OH, **9a**Z-Ahpb(THP,*i*Pr₂)-OBzl, **10a**Ahpb(THP,*i*Pr₂), **11a**Fmoc-Ahpb(THP,*i*Pr₂)-OH, **12a**



Lebenslauf

Name	Arndt Wiemann
Geburtstag	23.06.1968
Geburtsort	Braunschweig
Familienstand	verheiratet
Eltern	Eberhard Wiemann, Studiendirektor Irmhild Wiemann, geb. Krause, Hausfrau
Schulbildung	1974 - 78 Grundschule Heinrichstraße, Braunschweig 1978 - 80 Orientierungsstufe Franzses Feld, Braunschweig 1980 - 87 Gymnasium Neue Oberschule, Braunschweig 1987 Abitur
Wehrdienst	1987 - 88 Panzergrenadierbataillon 13, Wesendorf
Studium	10.1988 Diplom-Studiengang Chemie, - 10.1993 Technische Universität Braunschweig 18.04.1991 Vordiplom 01.11.1993 Diplom-Arbeit an der Gesellschaft für Biotechnologische - 14.01.1995 Forschung (GBF) in Braunschweig, AG Dr. R. Frank, Titel: „Synthese von Phosphonatderivaten des Phosphose- rins und deren Anwendung in der chemischen Peptidsyn- these“ 27.03.1995 Abschluß Diplom 01.05.1995 Beginn der Dissertation an der GBF, AG Dr. R. Frank
Berufsweg	01.02.1995 Anstellung an der GBF als Wissenschaftliche Hilfskraft - 30.04.1995 01.05.1995 Anstellung an der GBF als Wissenschaftlicher Mitarbeiter - 30.04.1998